



**Rute Miriam Santos Moraes**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

## **Utilização de Nanopartículas Circulantes (Extracelulares) como Biomarcadores na Calcificação Vascular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética  
Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria dos Anjos Lopez-Macedo, Prof.  
Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: António Pedro Alves de Matos,  
Investigador Responsável Cmicros e Diretor Executivo  
Ciiem, Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes  
Bernardes Gonçalves

Arguente: Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa  
Diniz

Vogal: Prof. Doutora Maria dos Anjos Lopez-Macedo



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2017**



**Rute Miriam Santos Moraes**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

## **Utilização de Nanopartículas Circulantes (Extracelulares) como Biomarcadores na Calcificação Vascular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e  
Biomedicina

Orientadora: Maria dos Anjos de Lopez-Macedo, Prof. Auxiliar,  
FCT-UNL

Co-orientador: António Pedro Alves de Matos, Investigador  
Responsável Cmicros e Diretor Executivo do Ciiem,  
Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardes  
Gonçalves

Arguente: Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz

Vogal: Prof. Doutora Maria dos Anjos Lopez-Macedo

**Março de 2017**



## Utilização de Nanopartículas Circulantes (Extracelulares) como Biomarcadores na Calcificação Vascular

Copyright Rute Miriam Santos Morais, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Resumo

A Calcificação Vascular (VC) é um processo ativo e regulado ao nível celular, dependente da existência de inibidores. Sabe-se que a diferenciação osteocondrogénica das células vasculares do músculo liso (VSMCs), a desregulação da deposição mineral e a libertação de vesículas contribuem para a VC. Na ausência das proteínas, Fetuina-A, GRP e MGP, o Ca e P em circulação levam à mineralização dos vasos. A fetuina-A interage com o mineral formando o complexo Mineral-Fetuina (FMC) presente na circulação e que impede a precipitação mineral. Pessoas com doença renal crónica (CKD) apresentam elevada propensão para a VC. O seu soro tem elevados níveis de Ca e P e baixos níveis de proteínas modeladoras da mineralização ectópica, o que leva à formação de FMCs.

Pretendeu-se caraterizar a relação entre os FMCs e a VC na CKD. Procedeu-se a i) avaliação da calcificação em tecidos da aorta em cultura *ex-vivo*, ii) estudos *in vitro* que mimetizassem os FMCs na presença das proteínas modeladoras da mineralização, iii) estudos morfológicos por microscopia eletrónica (EM) SEM e TEM, de FMCs isolados de soro de doentes CKD, FMCs controlo e comparação com BCPs sintéticos, iv) imunodeteções de proteínas inibidoras da calcificação em FMCs e BCPs por TEM v) análises por EDS e ICP e espectroscopia de FTIR para caracterização do mineral de CaP formado.

Mostrou-se que os FMCs estão presentes em pacientes saudáveis com os mesmos constituintes dos FMCs dos doentes, mas com menores níveis de algumas proteínas inibidoras da mineralização. Observou-se por EM a presença de cristalitos nos FMCs de doentes, caraterísticos de HA. As restantes técnicas de análise confirmaram a presença de Ca e P. Sugere-se a possível utilização de FMCs como biomarcadores da VC e como alvo de terapêutica.

**Palavras-Chave:** Biomarcadores, Calcificação Vascular, CKD, FMC, Mineralização Ectópica e TEM.





## Abstract

Vascular Calcification (VC) is an active and regulated process at cellular level, dependent on the presence of inhibitors. It is known that osteochondrogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), mineral deposition deregulation and vesicle release contribute to VC. In the absence of GRP, Fetuin-A and MGP, circulating Ca and P leads to vessel mineralization. Fetuin-A interacts with mineral particles to form the Fetuin-Mineral Complex (FMC), preventing mineral precipitation. Patients with chronic kidney disease (CKD) have VC. Its serum has high Ca and P levels and low levels of GRP, Fetuin-A and MGP, which lead to FMCs formation.

The purpose of this study was to characterize the relationship between FMCs and VC in CKD. Calcification was evaluated in aortic tissues in *ex-vivo* culture. *In vitro* studies were made to mimic FMCs in the presence of GRP, Fetuin-A and MGP. Morphological studies of FCMs isolated from healthy and CKD patients were compared with synthetic BCPs using SEM and TEM techniques. Immunodetection protocols were optimized for the detection of calcification inhibitor proteins by TEM in FMCs and BCPs. CaP mineral was characterized by EDS, ICP and FTIR spectroscopy.

We showed that FMCs of healthy and CKD patients have the same constituents, but with different levels of some mineralization inhibiting proteins. Crystallites presence in patient's FMCs, characteristic of HA, were observed by TEM. Other techniques confirmed the presence of Ca and P

In the present thesis FMCs are suggested as VC biomarkers as well possible therapeutic targets.

**Key Words:** Biomarkers, Vascular Calcification, CKD, FMC, Ectopic Mineralization and TEM.



## Lista de Abreviaturas e Siglas

**AB** – Anticorpo.

**AHSG** – “ $\alpha_2$ -*Heremans Schmid Glicoprotein*”.

**ALP** – Fosfatase Alcalina.

**Anx-2** – Anexina 2.

**Au- 5nm** – Ouro de 5nm.

**Au-10nm** – Ouro de 10nm.

**BCP** – Complexo de Ca/P.

**BMP-2** – Proteína Morfogenética 2 do Osso.

**BSA** – Albumina de Soro Bovino.

**BSE** – Eletrão Retrodifundido.

**CaP** – Fosfato de cálcio.

**CaSR** – Recetor Sensível a Cálcio.

**Cbaf1** – “*Core-Binding Factor Subunit  $\alpha$ -1*”.

**CKD** – Doença Renal Crónica.

**CPP** – Partícula de Calciproteína.

**CPP1** – Partícula de Calciproteína em Estadio 1.

**CPP2** – Partícula de Calciproteína em Estadio 2.

**CRP** – Proteína C Reativa.

**CTR** – Controlo.

**CVC** – Célula Indutora de Calcificação.

**CVD** – Doença Cardiovascular.

**ECM** – Matriz Extracelular.

**EDS** – “*Energy Dispersive X-Ray*”

**EM** – Microscopia Eletrónica.

**FetA** – Fetuina-A.

**FetB** – Fetuina-B.

**FetH** – Fetuina-A Humana.

**FMC** – Complexo Mineral-Fetuina.

**FTIR** – Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de *Fourier*.

**GGCX** – Enzima Gamacarboxilase.

**Gla** – Resíduos de Glu Carboxilados.

**Glu** – Ácido Glutâmico.

**GRP** – Proteína *Gla Rich*.

**HA** – Hidroxiapatite.

**ICP-AES** - Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente.

**LaB<sub>6</sub>** – Hexaboreto de Lantânio.

**MAC** – Calcificação Arterial Média.

**MGP** – Proteína Gla da Matriz.

**MM** – Meio Mineralizante.

**MMP** – Metaloprotease da Matriz.

**MO** – Microscopia Óptica.

**MVBs** – Corpos Multivesiculares.

**MVs** – Vesículas da Matriz.

**OA** – Osteoartrite.

**P<sub>t</sub>1** – Cotransportador 1 de Pirofosfato.

**PBS** – “*Phosphate Buffer Saline*”.

**PMC** – “*Phosphate Mineral Complex*”.

**rGRP** – Proteína *Gla Rich* Recombinante.

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio.

**Runx2** – “*Related Transcription Factor 2*”.

**SEM** – Microscópio/Microscopia Eletrônico/a de Varrimento.

**Ser** – Serina.

**SM** – Actina  $\alpha$  do Músculo Liso.

**SMPD-3** – Fosfodiesterase de Esfingomielina 3.

**stGRP** – Proteína *Gla-Rich* de esturção.

**TEM** – Microscópio/Microscopia Eletrônico/a de Transmissão.

**TGF** – Taxa de Filtração Glomerular.

**TGF  $\beta$**  – *Transcription Growth Factor  $\beta$* .

**tGRP** – GRP total.

**tMGP** – MGP total.

**Ucmaa-** “*upper zone growth plate and cartilage matrix associated protein a*”.

**Ucmab** – “*upper zone growth plate and cartilage matrix associated protein b*”

**VC** – Calcificação Vascular.

**VKDP** – Proteína Dependente de Vitamina K.

**TEM** – Microscópio/Microscopia Eletrônico/a de Varrimento.

**VSMC** – Célula Vascular do Músculo Liso.

**WDS** – Microanálise por Detecção de Comprimento de Onda.

## ÍNDICE DE TEXTO

I.	Introdução.....	1
I.1.	Calcificação Vascular .....	1
I.1.1.	Classificação Histoanatômica da Calcificação Vascular .....	1
I.1.2.	Patofisiologia da Calcificação Vascular .....	2
I.1.3.	Matriz Extracelular e Degradação da Elastina .....	2
I.1.4.	Células Vasculares do Músculo Liso e Libertação de Vesículas Extracelulares .....	3
I.1.5.	Exossomas e o seu papel na Calcificação Vascular.....	5
I.1.6.	Correlação entre Calcificação Vascular e Doença Renal Crónica .....	6
I.1.7.	Reguladores e Proteínas Modeladoras da Calcificação .....	7
I.1.7.1.	Elevados Níveis de Cálcio e Fósforo .....	7
I.1.7.2.	Proteína Gla da Matriz ou MGP.....	8
I.1.7.3.	Proteína <i>Gla Rich</i> ou GRP.....	8
I.1.7.4.	Proteína Fetuina-A.....	9
I.1.7.5.	Relação entre Fetuina-A e Partículas de Calciproteína/Complexos Mineral - Fetuina- A.....	11
I.1.8.	Terapêutica na Calcificação Vascular.....	13
I.2.	Microscopia Eletrónica ou EM.....	15
I.2.1.	Microscopia Eletrónica de Transmissão ou TEM.....	15
I.2.1.1.	Imunodeteção Acoplada a Partículas de Ouro em TEM.....	17
I.2.2.	Microscopia Eletrónica de Varrimento ou SEM .....	18
I.3.	Espetroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier ou FTIR .....	20
I.4.	Espetrometria de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente ou ICP-AES.....	20
I.5.	Objetivos .....	21
II.	Materiais e Métodos .....	23
II.1.	Materiais .....	23
II.1.1.	Químicos e Reagentes .....	23
II.1.2.	Anticorpos para Imunodeteção de GRP, Fetuina-A e MGP em TEM. ....	23
II.1.3.	Equipamento .....	24
II.2.	Métodos.....	24
II.2.1.	Cultura de Tecidos de Cortes Histológicos de Fragmentos da Aorta e Recolha das Amostras .....	24
II.2.2.	Fixação e Cortes dos Tecidos de Fragmentos da Aorta para Análise por TEM .....	25
II.2.3.	Produção de Grelhas para TEM .....	25
II.2.4.	Produção de BCPs Sintéticos.....	26
II.2.5.	Tratamento e Análise dos BCPs Sintéticos em TEM.....	26
II.2.6.	Obtenção dos FMCs dos Soros de Doentes Renais Crónicos e de Pacientes Saudáveis ...	26

II.2.7.	Análise por TEM dos FMCs Biológicos.....	27
II.2.8.	Imunodeteção em TEM das Proteínas Modeladoras da Mineralização Ectópica .....	28
II.2.9.	Colocalização de GRP e Fetuina-A Humana em TEM .....	29
II.2.10.	Preparação das amostras FMC e BCP para SEM e Microanálise.....	30
II.2.11.	Análise FTIR de FMC Biológico.....	30
II.2.12.	Análise por ICP-AES de FMC Biológico .....	30
II.2.13.	Tratamento de imagens de TEM .....	30
III.	Resultados.....	33
III.1.	Caraterização Morfológica por TEM dos Tecidos de Fragmentos da Aorta Submetidos a Condições Mineralizantes e na Presença das Proteínas stGRP e rGRP. Presença de MVs com Material Calcificado e Elastina Degradada.....	33
III.2.	Caraterização Morfológica por TEM de BCPs Sintéticos na Presença de Proteínas Modeladoras da VC – FetA, stGRP, rGRP – ou na Presença de Mistura de Proteínas – FetA, MGP e stGRP. Mudanças Morfológicas Identificáveis na Presença Individual das Proteínas Estudadas e na Presença da Mistura Proteica.....	36
III.3.	Caraterização Morfológica por TEM de Amostras de FMCs Biológicos Isolados do Soro de Indivíduos Saudáveis e de Doentes com CKD. Estruturas Morfollogicamente Distintas entre Amostras de Indivíduos Saudáveis e Amostras de Doentes com CKD.....	38
III.4.	Comparação Morfológica por TEM de Amostras de FMCs Biológicos Derivados de Indivíduos Saudáveis e de Doentes com CKD com Amostras de BCPs Sintéticos. Estruturas Morfológicas Semelhantes Encontradas entre FMCs Biológicos e BCPs Sintéticos.....	40
III.5.	Imunodeteção em TEM das Proteínas Modeladoras do Processo de Mineralização Vascular – GRP, fetA e MGP - em BCPs Sintéticos. Antígenos Detetados com Especificidade por Anticorpos Conjugados com Nanopartículas de Ouro de Diâmetros Diferentes .....	42
III.6.	Colocalização em TEM de Proteínas Modeladoras da Mineralização Vascular – Fetuina-A Humana e GRP- em FMCs Biológicos. Marcação Distinta dos Dois Antígenos a Detetar através de Anticorpos Secundários Conjugados com Nanopartículas de Ouro .....	44
III.7.	SEM-EDS e Microanálise de FMCs Biológicos Isolados de Doentes com CKD, de Indivíduos Saudáveis e de BCPs sintéticos. Presença de Fósforo e Cálcio nas Amostras Detetados por SEM-EDS .....	47
III.8.	Espetroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR) de FMCs Biológicos Isolados do Soro de uma <i>Pool</i> de Doentes CKD. Identificação do Grupo Fosfato .....	51
III.9.	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES). Presença mais Elevada para o Elemento Cálcio.....	52
IV.	Discussão e Conclusões .....	53
	Referências Bibliográficas.....	59
	Anexos .....	A1
	Protocolo A.1 – Preparação e Corte das Amostras para SEM e TEM .....	A2
	Protocolo A.2 – Aquisição e Manuseamento do TEM .....	A3
	Protocolo A.3 – Adsorção da Amostra à Grelha Contraste Negativo para grelhas TEM.....	A7
	Protocolo A.4 – Imunodeteção em TEM.....	A8
	Protocolo A.5 – Produção de grelhas para TEM .....	A11

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 - Esquematização do Papel do Fosfato na Indução de Autofagia e na Libertação de MVs pelas VSMCs.....	4
Figura I.2 - Esquematização Estrutural da FetA e FetB e Seus Domínios Relacionados. ....	10
Figura I.3 - Esquematização da Maturação das CPPs/FMCs.. ....	12
Figura III.4 - Morfologia dos Tecidos de Fragmentos da Aorta em Condições Mineralizantes e na Presença de stGRP e rGRP.....	35
Figura III.5 - Morfologia dos BCPs sintéticos por TEM na Presença de Proteínas Modeladoras da Mineralização .....	37
Figura III.6 - Morfologia por TEM de FMCs Biológicos Isolados do Soro de Pacientes Saudáveis e de Doentes com CKD em estadio 5 (CKD5).. ....	39
Figura III.7 - Comparação Morfológica por TEM de FMCs Biológicos Derivados de Doentes com CKD e de Indivíduos Saudáveis com BCPs sintéticos.....	41
Figura III.8 - Imunodeteções em TEM de Proteínas Modeladoras do Processo de Mineralização Vascular (GRP, FetA e MGP) em BCPs Sintéticos.....	43
Figura III.9 - Colocalização em TEM de Proteínas Modeladoras da Mineralização Vascular - Fetuina Humana e GRP – em FMCs Biológicos Isolados de Indivíduos Saudáveis.....	45
Figura III.10 - Colocalização em TEM de Proteínas Modeladoras da Mineralização Vascular - Fetuina Humana e GRP – em FMCs Biológicos Isolados de Doentes com CKD.....	46
Figura III.11 - Morfologia de BCP Sintético Produzido na Presença de GRP, fetA e MGP por SEM e Seus Respetivos Espetros Elementares obtidos por EDS.. ....	48
Figura III.12 – Morfologia de BCP Sintético Produzido na Presença de GRP, FetA e MGP e Mapeamento Elemental por EDS.....	48
Figura III.13 - Morfologia por SEM de FMCs Biológicos Isolados do Soro de um Indivíduo Saudável e seu respetivo Espetro Elemental obtido por EDS. ....	49
Figura III.14 - Morfologia de FMCs Biológicos Isolados do Soro de um Indivíduo e Mapeamento Elemental por EDS. ....	49
Figura III.15 - Morfologia por SEM de FMCs Isolados de um Doente com CKD e Seus Respetivos Espetros Elementares obtidos por EDS. ....	50
Figura III.16 - Morfologia de FMCs Biológicos Isolados do Soro de um Doente com CKD e Mapeamento Elemental por EDS. ....	51
Figura III.17 – FTIR de uma Região da Amostra de FMCs Biológicos Isolados do Soro de uma Pool de Doentes CKD no mesmo Estadio da Doença.....	52
Figura III.18 - FTIR de uma Outra Região da Amostra de FMCs Biológicos Isolados do Soro de uma Pool de Doentes CKD no mesmo Estadio da Doença.. ....	52
Figura A.19 - Painel Esquerdo do TEM utilizado.....	A3
Figura A.20 – Porta Amostras.....	A3
Figura A.21 – Coluna TEM com Inserção para o Porta Amostras.....	A4
Figura A.22 - Parafusos Macrométricos destacados pelos retângulos.....	A4

Figura A.23 – Parafusos para Varrer a Preparação/Grelha segundo os Eixos xx e yy. ....	A5
Figura A.24 - Parafusos para Ampliação (M) e (N) e focagem (O) no Painel Direito. ....	A5
Figura A.25 – Roldana do Painel Direito para Inserção da Máquina Fotográfica. ....	A6



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II.1 - Anticorpos Primários Utilizados e Respetiva Informação. ....	23
Tabela II.2 - Anticorpos Secundários Utilizados e Respetiva Informação. ....	23
Tabela II.3– Designação e Descrição das Amostras de FMCs Biológicos .....	27
Tabela II.4 - Imunodeteções Realizadas e Combinações de Anticorpos Utilizados. ....	28
Tabela II.5 – Colocalização de GRP e Fetuina-A Humana, Respetivas Combinações de Anticorpos e Controlos à Experiência. ....	29
Tabela A.6 - Reagentes para Preparação de PBS. ....	A1
Tabela A.7 - Anticorpos utilizados nas imunodeteções em EM. ....	A8
Tabela A.8 - Exemplo de Combinações de Condições a Usar para Imunodeteção. ....	A10
Tabela A.9 - Exemplo de Combinações de Condições a Usar para Colocalização. ....	A10



## **I. Introdução**

### **I.1. Calcificação Vascular**

Calcificação Vascular (VC) é a designação dada para a deposição inapropriada de cristais de fosfato de cálcio (CaP) nos tecidos levando a uma mineralização ectópica. Este processo acontece com a progressão da idade mas é, muitas vezes, acelerada por outros processos patológicos, tais como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças genéticas específicas (Kapustin et al., 2015, Paloian e Giachelli, 2014).

A maior causa de VC está associada à doença renal crônica (CKD). Os pacientes com CKD têm inúmeras complicações que variam desde hipertensão, anemia, perturbações do metabolismo do osso até a disfunção e calcificação vasculares, existindo uma forte prevalência da VC quando o metabolismo de cálcio e fosfato está comprometido. Está provado que há uma correlação patofisiológica entre a falha renal e o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares na população em geral e especificamente em doentes portadores de CKD (Kapustin et al., 2011).

Os elevados níveis de cálcio e fósforo contribuem para que as células vasculares do músculo liso (VSMCs) se transdiferenciem em células em tudo semelhantes aos osteoblastos. Estes níveis também potenciam a libertação de vesículas, o aumento da apoptose e a degradação da matriz extracelular (ECM) (Kapustin et al., 2011). Uma disfunção no metabolismo do cálcio e do fosfato tem, ainda, importância na diminuição dos níveis das proteínas modeladoras da mineralização e da formação do mineral de CaP (Lu et al., 2014, Shroff et al., 2013). As VSMCs são o interveniente principal na VC, uma vez que a progressão desta está relacionada com a sua transdiferenciação (Shroff et al., 2013).

A VC e a osteoporose são doenças associadas à idade. No entanto há outros fatores biológicos que correlacionam a VC com o mau funcionamento do metabolismo do osso com possibilidade de ocorrência de osteoporose e arteriosclerose (Lu et al., 2014).

#### **I.1.1. Classificação Histoanatómica da Calcificação Vascular**

A classificação da VC depende do local da sua ocorrência e pode ser dividida em Aterosclerose e Arteriosclerose (Lu et al., 2014).

A aterosclerose tem o seu início na juventude e progride com a idade. Consiste na inflamação e calcificação da camada íntima das artérias, com consequente espessamento dos vasos. A camada íntima é maioritariamente constituída por células endoteliais e por tecido conjuntivo subendotelial. Sendo caracterizada pela presença de placas lipídicas na túnica íntima das paredes das artérias, que podem sofrer rutura, por microinflamações das placas ateroscleróticas. Existe formação de trombos que podem originar uma doença oclusiva das artérias. A aterosclerose ocorre em artérias de médio calibre e próxima das ramificações dos vasos capilares. São exemplos das artérias afetadas pela aterosclerose a carótida, a artéria ilíaca, a femoral e a epicardial coronária (Lu et al., 2014). As principais causas de aterosclerose são a idade, a hipertensão e o tabagismo. A aterosclerose está fortemente relacionada com isquemia cardíaca (Shroff et al., 2013).

A arteriosclerose ou calcificação arterial média (MAC), ou ainda conhecida por esclerose de *Mönckeberg's*, ocorre nas camadas médias das artérias afetadas. Essas camadas são constituídas por

VSMCs e uma ECM rica em elastina. A MAC é caracterizada por fibrose, espessamento e rigidez das artérias, calcificação da camada média da artéria e por conseguinte pode acarretar hipertrofia ventricular. Nesta patologia ocorre um aumento da deposição mineral na ECM, degradação da elastina e liberação de corpos apoptóticos (Lu et al., 2014).

Os vasos capilares são um ambiente dinâmico sob constante influência de fatores externos e internos que os fazem perder as suas capacidades fisiológicas, assumindo determinadas patologias que ocorrem nos seus variados tipos de células em especial nas VSMCs levando à sua morte. Em última instância fatores patológicos como as partículas de CaP podem ser causadores de VC por deposição mineral. No entanto em ambiente fisiológico a deposição mineral é dependente da presença de proteínas na circulação como a Fetuina-A (FetA), com capacidade de ligar o mineral de Ca/P (Lu et al., 2014).

### **I.1.2. Patofisiologia da Calcificação Vascular**

Os pacientes com insuficiência renal crônica (CKD) apresentam um maior risco cardiovascular nomeadamente devido aos elevados níveis de cálcio e fósforo em circulação (hiperfosfatemia e hipercalcemia). Esta alteração ao nível do metabolismo mineral está diretamente ligada à elevada incidência de calcificação vascular nestes doentes.

A VC compreende processos ativos como a transdiferenciação das VSMCs em células fenotipicamente idênticas a osteoblastos e processos passivos como a deposição mineral. Por outro lado o processo de transdiferenciação osteocondrogénica favorece a liberação de vesículas extracelulares designadas por MVs contendo mineral de Ca/P que ao depositar-se na ECM promove a sua calcificação favorecendo a mineralização ectópica dos tecidos (Viegas et al., 2015, Lu et al., 2014).

A morte celular, nomeadamente a apoptose, funciona como centro de nucleação e deposição de mineral, através da liberação de corpos apoptóticos (Lu et al., 2014). A liberação destas vesículas é estimulada por elevados níveis cálcio e por sua vez contribuem para o aumento dos níveis de cálcio para o meio extracelular. O cálcio libertado para o meio estimulará ainda mais a apoptose, ou seja, existe um ciclo em que morte celular causa maior liberação de cálcio e a liberação deste ião causa mais morte celular (Shroff et al., 2013). Os corpos apoptóticos são muitas vezes comparados às MVs devido à sua competência para a nucleação mineral (Cui et al., 2016).

Nanopartículas constituídas por mineral de cálcio e fosfato e proteínas com afinidade para a ligação ao mineral (CPPs) também desempenham um papel importante na morte celular, uma vez que estas após internalização pelas VSMCs e sua respetiva degradação lisossomal são responsáveis pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Estudos provaram que partículas de mineral CaP sintéticas, que designaremos por BCPs – partículas de fosfato de cálcio que incluem vários tipos de cristais, nomeadamente hidroxiapatite (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) – têm uma maior competência para induzir a transformação das VSMCs em comparação com o fosfato na sua forma solúvel (Shroff et al., 2013).

### **I.1.3. Matriz Extracelular e Degradação da Elastina**

A ECM das VSMCs é composta por colagénio e elastina maioritariamente, e por outros constituintes tais como fibronectinas e proteoglicanos.

A elastina é secretada pelas VSMCs em forma de monómero, a tropoelastina. A fragmentação da elastina pode implicar um agravamento da VC em doentes renais (Lu et al., 2014).

A disrupção da elastina faz com que a ECM tenha afinidade para se ligar à HA e para potenciar o crescimento mineral, levando em parte à mineralização das fibras elásticas (Lu et al., 2014). Esta degradação proteica verifica-se em casos de uremia e em pacientes com CKD. A degradação da elastina é causada por proteases, as metaloproteases da matriz (MMP), MMP-2 e MMP-9. Estas MMPs são sobreexpressas em CKD. E por último pela protease Catepsina- S (Paloian e Giachelli, 2014).

A elastina degradada é responsável pela sobreexpressão do fator de crescimento TGF- $\beta$  envolvido na diferenciação em osteoblastos e também é a causa preponderante do aumento da rigidez das artérias (Paloian e Giachelli, 2014).

#### **I.1.4. Células Vasculares do Músculo Liso e Libertação de Vesículas Extracelulares**

As VSMCs em ambiente indutor de calcificação perdem as suas propriedades contráteis, por silenciamento de genes responsáveis pelo seu normal fenótipo (Shroff et al., 2013). Em suma, as VSMCs diminuem a expressão dos genes específicos do músculo liso, actina  $\alpha$  do músculo liso (SM) e SM22 $\alpha$  (Paloian e Giachelli, 2014, Shanahan, 2013), em detrimento de genes responsáveis pelas características osteocondrogénicas, tais como Runx2/Cbaf1 (Shroff et al., 2013).

Como será mencionado mais detalhadamente em “ I.1.7. Reguladores e Proteínas Modeladoras da Calcificação”, elevados níveis de Ca e P despoletam uma cascata de sinal indutora da calcificação, pois estimulam a proteína morfogenética 2 do osso (BMP-2) que por sua vez irá regular fatores de transcrição responsáveis pela formação de osso. A BMP-2 regula e ativa Runx2. Sendo este responsável pela transformação de células do mesênquima em células osteoblásticas (Shroff et al., 2013).

As VSMCs libertam MVs cuja função está bem explicada na mineralização do osso, mas mais recentemente estas vesículas mostraram-se associadas à VC (Paloian e Giachelli, 2014).

As MVs são vesículas extracelulares envolvidas no processo de nucleação mineral e no início da osteogénese (Viegas et al., 2015). As VSMCs libertam vesículas semelhantes no processo patológico de calcificação (Viegas et al., 2015, Kapustin et al., 2011).

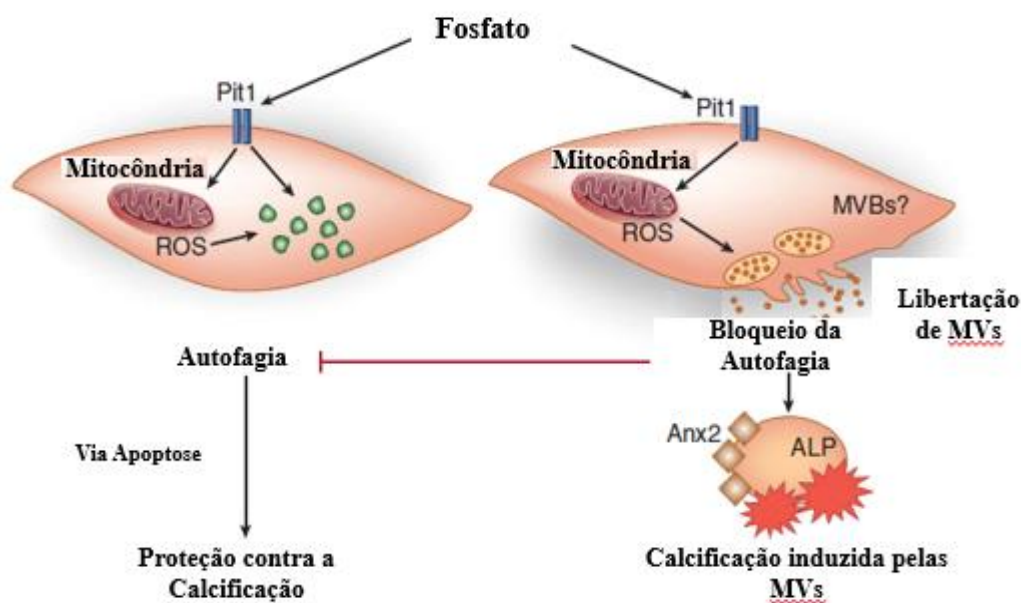
Determinados estudos de microscopia eletrónica mostraram que estas vesículas são o primeiro local de nidificação para a mineralização (Kapustin et al., 2015, Cui et al., 2016). No entanto, existem limitações em relação a estudos de microscopia para identificação de MVs uma vez que outras estruturas membranares podem estar presentes na preparação e serem confundidas com as MVs. Estas estruturas delimitadas por membrana podem ser idênticas em forma e tamanho a MVs dificultando a confirmação de que se trata efetivamente de vesículas extracelulares da matriz (Cui et al., 2016).

As MVs são estruturas heterógenas no tamanho, número e no seu conteúdo mineral (Kapustin et al., 2015, Kapustin et al., 2011). Contêm no seu interior proteínas, lípidos e microRNAs e são dependentes das anexinas, II, V e VI para desempenharem um papel idêntico às MVs associadas ao metabolismo do osso (Paloian e Giachelli, 2014). Em artérias não calcificadas as anexinas 5 e 6 não são detetáveis (Cui et al., 2016). No entanto, junto de MVs indutoras de calcificação a anexina 6

encontra-se presente e quando existe um silenciamento ou ablação do gene que a codifica existe uma redução da calcificação. Portanto a anexina 6 é um regulador da mineralização (Kapustin et al., 2011). No entanto, a sua existência nas membranas das MVs é importante na homeostasia do cálcio e limita os danos causados nas células pelo excesso deste ião (Kapustin et al., 2011).

Estudos comprovaram que quando a autofagia se encontra inibida as VSMCs tratadas com fosfato libertam um maior número de MVs da sua matriz (Paloian e Giachelli, 2014, Shanahan, 2013). A autofagia tem um efeito protetor sobre as células quando não se encontra inibida (Cui et al., 2016). No entanto, VSMCs tratadas com elevados níveis de P apresentam um aumento dos marcadores para autofagia e no seu citoplasma são encontrados muitos autofagossomas. Os elevados níveis de fosfato por sua vez potenciam a produção de espécies oxidativas de oxigénio (ROS) que por conseguinte vão ser indutoras da autofagia. A autofagia gera apoptose celular que promove a calcificação.

Existe uma controvérsia quanto à autofagia segundo alguns autores, pois quando esta está inibida há libertação de MVs indutoras de calcificação o que mostra que o seu bom funcionamento é requerido. Contudo quando a autofagia acontece existe a libertação de corpos apoptóticos que também são promotores da VC. O que se conclui é que as MVs no entanto são mais fortemente indutoras de VC que os corpos apoptóticos (**Figura I.1**) (Shanahan, 2013).



**Figura I.1 - Esquematização do Papel do Fosfato na Indução de Autofagia e na Libertação de MVs pelas VSMCs.** Níveis de fosfato induzem a libertação de ROS e consequente autofagia nas VSMCs, promovendo a proteção contra a calcificação. Embora tenha alguma apoptose associada como consequência da autofagia despoletada não há libertação de MVs. Quando a autofagia está bloqueada, as VSMCs libertam MVs carregadas de Ca e P, fosfatase alcalina (ALP) e anexina-2 (Anx2). A libertação destas MVs é mais competente que a apoptose na promoção da calcificação. Pensa-se que a libertação das MVs é via fusão da membrana dos corpos multivesiculares (MVBs) com a membrana plasmática. Adaptado de (Shanahan, 2013).

As MVs das VSMCs em condições normais possuem no seu interior proteínas modeladoras do processo patológico de calcificação. No entanto, em condições indutoras de calcificação as MVs possuem elevados níveis de Ca e P intravesiculares, podem estar no seu interior cristais de HA e têm sempre a si associadas baixos níveis ou ausência de proteínas modeladoras da VC. Estas estruturas

vesiculares contêm fosfatase alcalina (ALP) responsável pela degradação do pirofosfato, dando origem a uma fonte rica em fosfato que potencia o crescimento cristalino (Shroff et al., 2013, Shanahan, 2013).

Embora os níveis de CaP sejam um dos principais fatores na progressão da VC, uma vez que o fosfato quando em alta concentração no soro entra para dentro das VSMCs via cotransportadores de fosfato ( $P_i$ -1), estes mesmos níveis são responsáveis pelo funcionamento fisiológico de contratilidade das VSMCs, quando sentidos pelos canais de voltagem e regulados pelos sensores de cálcio nas células de forma orquestrada. O sensor de cálcio CaSR quando exposto a elevados níveis de cálcio sofre uma diminuição da sua expressão, potenciando assim a calcificação (Shroff et al., 2013).

A calcificação inicia-se nas MVs, nas suas membranas e progride para a ECM, pelo que estas estruturas são consideradas como um dos principais intervenientes no processo de calcificação (Kapustin et al., 2011).

A origem das MVs pode dar-se na membrana plasmática. A confirmação advém da presença de determinadas proteínas, marcadores da membrana celular, tais como a actina e proteínas que regulam a actina. No entanto, a biogénese das MVs pode ter origem endossomal (Kapustin et al., 2011). Neste processo a existência de uma protuberância que se origina da membrana, libertando-se da mesma e originando uma MV está dependente da polarização da membrana. As MVs depois de perderem a adesão à membrana plasmática prosseguem até à ECM, onde se depositam (Cui et al., 2016).

#### **I.1.5. Exossomas e o seu papel na Calcificação Vascular**

Como foi dito as MVs estão carregadas com múltiplas proteínas incluindo inibidores da mineralização, tal como a FetA. Estudos comprovaram, recentemente, que a FetA é internalizada pelas VSMCs e o caminho que a mesma percorre, dentro das MVs, acontece por via endossomal. A sua libertação está intimamente ligada à libertação de exossomas pelos corpos vesiculares múltiplos (MVBs), durante a qual a sua membrana se funde com a membrana plasmática (Cui et al., 2016, Kapustin et al., 2015, Shanahan, 2013). A sua libertação depende da regulação levada a cabo pela fosfodiesterase de esfingomielina 3 (SMPD3), considerada como reguladora da biogénese dos exossomas. A inibição deste regulador bloqueia a sua secreção e por conseguinte a calcificação fica menos propensa a acontecer (Cui et al., 2016, Kapustin et al., 2015).

Em estudos recentes verificou-se que os exossomas das VSMCs são as MVs responsáveis pela VC (Kapustin et al., 2015, Shanahan, 2013). Os exossomas que derivam das VSMCs têm proteínas de ligação preferencial ao cálcio e proteínas da ECM e são ao mesmo tempo idênticos a outros exossomas naturais de outras células (Kapustin et al., 2015).

A definição tradicional de exossomas caracteriza-os como sendo vesículas de origem endossomal, delimitadas por membrana, secretados por diferentes tipos de células e encontradas em diferentes fluidos biológicos, como sangue e urina, e em diferentes tecidos/órgãos.

Em resposta a condições indutoras de calcificação, em doentes com CKD foram detetados MVBs contendo exossomas nos seus vasos sanguíneos. As VSMCs mostraram um aumento na sua capacidade de produzir exossomas, levando a um aumento considerável na calcificação. Pois a

anexina 6 e a fosfatidil serina ao estarem expostas na membrana das MVs tornam-nas em locais perfeitos para a iniciação do processo de mineralização ectópica (Kapustin et al., 2015).

Outros autores mencionam que a calcificação da ECM é iniciada pela deposição de vesículas que contêm CaP. Estas vesículas que estavam carregadas de FetA e MGP mostraram ser na sua maioria exossomas, uma vez que foram identificadas na sua constituição proteínicas de cariz endossomal (Viegas et al., 2015).

O tamanho destas vesículas libertadas pelas VSMCs varia entre 30-520nm. No entanto não há um consenso quanto ao tamanho existindo autores que afirmam que o tamanho dos exossomas está entre 30-300nm de diâmetro. Geralmente distinguem-se, ainda que com dificuldades e não com total certeza, pelo seu tamanho em relação às MVs, uma vez que o tamanho estabelecido para estas é de 100-1000nm. (Cui et al., 2016).

Para além das proteínas e lípidos de membrana, os exossomas são caracterizados por conterem proteínas responsáveis pelo tráfico endossomal e tráfico de membranas. Também as tetraspaninas são comuns na superfície dos exossomas juntamente com proteínas de choque térmico, do citoesqueleto, de enzimas metabólicas, de moléculas de adesão e de proteínas de transdução na cascata de sinal.

Segundo estudos de imagiologia por TEM-EDX, os exossomas libertados pelas VSMCs contêm, em condições indutoras de calcificação, um precipitado negro composto por CaP. Esta característica apenas é visível em exossomas com competência para induzir calcificação e não aparenta ter uma forma cristalina, isto é, o precipitado de CaP apresenta uma forma mais arredondada e amorfa (Kapustin et al., 2015).

Os vasos em pré-calcificação são alvo de deposição de exossomas, sugerindo que a sua presença predisponha os vasos a calcificar. Os exossomas podem ser considerados, em última instância, como potenciais biomarcadores de VC, na medida em que são detetáveis nos estadios iniciais de VC (Kapustin et al., 2015).

#### **I.1.6. Correlação entre Calcificação Vascular e Doença Renal Crónica**

Existe uma forte correlação entre a falha renal e o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares na população em geral e em doentes com CKD (Shanahan, 2013). Estes doentes têm perturbações no metabolismo do osso o que favorece a progressão de VC nestes doentes (Shroff et al., 2013).

Estudos clínicos mostraram que doentes CKD em pré-diálise têm valores de proteínas modeladoras de VC preservados, o que lhes fornece uma proteção contra os elevados níveis de Ca e P no soro. No entanto, em doentes já em diálise renal foram encontradas várias artérias com elevados níveis de Ca e P, o dobro do nível encontrado em pacientes CKD em pré-diálise. Ou seja, baixos níveis de calcificação são visíveis em doentes em pré-diálise enquanto se denota uma exacerbada calcificação nos doentes submetidos a diálise (Shroff et al., 2013). No entanto, segundo outros estudos, VC é encontrada também em estadios mais precoces da doença CKD, nomeadamente em situações precedentes ao estadio 2 da doença (Paloian e Giachelli, 2014).

Os vasos capilares de doentes em diálise apresentam uma elevada diminuição no número de VSMCs. Isto deve-se a uma maior morte celular por apoptose. E em doentes em pré-diálise não se



verifica apoptose. A morte destas células não só diminui a produção de proteínas modeladoras da VC, como também aumenta o cálcio local, promovendo a VC e despoletando o ciclo de morte celular, anteriormente mencionado (Shroff et al., 2013).

Em doentes CKD jovens e nos estadios iniciais da doença prevalece a arteriosclerose em vez da aterosclerose, uma vez que HA só é visível na túnica média dos vasos calcificados (Paloian e Giachelli, 2014, Shroff et al., 2013).

### **I.1.7. Reguladores e Proteínas Modeladoras da Calcificação**

Segundo o estado da arte, existem vários reguladores proteicos responsáveis por manter o equilíbrio na mineralização da matriz, em vários tecidos e órgãos. Alguns são indutores da calcificação, levando ao descontrolo do mecanismo (Lee, 2011). Outros são inibidores impedindo que a mineralização passe de processo fisiológico a processo patológico (Viegas et al., 2015). Para além das proteínas que poderão induzir ou inibir a calcificação, os níveis dos iões cálcio e fosfato em circulação também são determinantes no processo de calcificação dos tecidos. Por isso todos estes intervenientes serão abordados nos próximos capítulos.

#### **I.1.7.1. Elevados Níveis de Cálcio e Fosfato**

Como mencionado anteriormente os elevados níveis de CaP são um potencial indutor da calcificação (Lee, 2011).

Quando os iões fósforo e cálcio se ligam ao fator de transcrição Cbaf1 ou RunX2 potenciam a ativação deste fator. Este fator de transcrição é conhecido por estimular a diferenciação das células estaminais do mesênquima em células osteoblásticas (Lee, 2011). O ião fosfato ao ser transportado para dentro da célula pelo cotransportador P<sub>1</sub>t1 aumenta os níveis de fosfato intracelular. O aumento dos níveis de fosfato orgânico faz aumentar a expressão de genes responsáveis pelas características osteoblásticas suprimindo ao mesmo tempo a expressão génica dos genes responsáveis pelo fenótipo fisiológico das células VSMCs (Lu et al., 2014, Lee, 2011).

Um aumento do cálcio, mesmo em condições em que o fosfato se apresenta em concentrações basais, leva a uma mineralização das VSMCs. E, mais, a hipercalcemia auxilia e aumenta a quantidade de fósforo que entra para dentro das células permitindo que a nucleação de HA ocorra na ECM (Askar, 2015).

Determinados estudos permitiram verificar que a fetA tem a capacidade de diminuir os efeitos citotóxicos que se devem ao aumento da concentração intracelular do ião cálcio reduzindo assim a morte celular das VSMCs (Dautova et al., 2014).

Em suma, podemos concluir que o efeito sentido pelos iões mencionados, que têm tendência a precipitar sob a forma de mineral de fosfato de cálcio, levam à progressão da calcificação. Esse efeito pode ser contrariado por certas proteínas que serão mencionadas a seguir.

### **I.1.7.2. Proteína Gla da Matriz ou MGP**

A MGP é uma das proteínas dependentes de vitamina K (VKDP) cuja função está comprometida quando os níveis de vitamina K são insuficientes (Paloian e Giachelli, 2014, Rafael et al., 2014, Mathieu e Boulanger, 2014, Lee, 2011).

A MGP tem 15 kDa de tamanho e é a única VKDP que retém a sequência do seu propéptido na proteína madura, sendo este o elemento mediador nas modificações após tradução, pelo retículo endoplasmático, facilitando a ligação das VKDPs à enzima gamacarboxilase (GGCX) (Wallin et al., 2001). Esta proteína é expressa nos ossos, dentes, pulmões, cartilagem, rins, coração, células musculares lisas (Paloian e Giachelli, 2014), vasos sanguíneos e válvulas da aorta (Mathieu e Boulanger, 2014).

Vários estudos demonstraram a importância da carboxilação- $\gamma$  dos resíduos de ácido glutâmico (Glu) – resíduos Glu gamacarboxilados designam-se por Gla na função da MGP (Lee, 2011, Wallin et al., 2001).

Níveis elevados da MGP não gamacarboxilada (ucMGP) são encontrados em situações mais tardias das doenças que estejam associadas à calcificação dos tecidos vasculares, que é o caso da CKD. A ucMGP é considerada a forma inativa da MGP e a sua forma carboxilada, cMGP, é tida como a forma ativa (Paloian e Giachelli, 2014).

A função da MGP pode ser comprometida pelo uso de determinados fármacos. Vários autores alertam para o facto de ser preciso um cuidado redobrado na prescrição de anticoagulantes, visto estes serem antagonistas da vitamina K, o que poderá comprometer a função das VKDPs (Cui et al., 2016, Viegas et al., 2015, Paloian e Giachelli, 2014).

### **I.1.7.3. Proteína Gla Rich ou GRP**

Viegas *et al.* isolaram uma nova VKDP, proveniente de cartilagem calcificada de esturjão adriático. A sua massa molecular é de 10,2 kDa. Em 74 resíduos de aminoácidos possui 16 resíduos Gla. Atribuíram-lhe o nome de “*Gla-rich Protein*” (GRP) por ser a proteína Gla com maior densidade destes resíduos, isto é, a GRP é a proteína gla com a maior razão entre número de resíduos Gla e tamanho total da proteína (Rafael et al., 2014, Viegas et al., 2014, Neacsu et al., 2011, Viegas et al., 2009, Viegas et al., 2008). A sequência da GRP é muito conservada, existindo uma identidade de 78% entre a GRP de esturjão e o seu ortólogo em humanos (Viegas et al., 2009, Viegas et al., 2008).

Esta proteína foi caracterizada como tendo duas isoformas, consequência duma duplicação do genoma na evolução das espécies. Viegas *et al.* designou os seus genes de *Grp1* e *Grp2*, enquanto Neacsu *et al.* os designou por *ucmaa* e *ucmab*, respetivamente (Neacsu et al., 2011, Viegas et al., 2008). No entanto, em estudos recentes foram encontradas duas novas isoformas, variantes de *splicing*, alternativo em humanos, e um novo transcrito em ratos (Rafael et al., 2014).

A GRP tem ortólogos em todos os grupos vertebrados de pelo menos em 48 espécies diferentes, no entanto não tem nenhum homólogo em invertebrados. Existe um parólogo, a GRP2, em *bony fish* (Viegas et al., 2008).

Recentemente, alguns estudos mostraram que a GRP está presente no tecido muscular liso, em ratos e humanos, nomeadamente na pele e no sistema vascular. Estes mesmos estudos foram importantes para definir o papel que esta proteína desempenha no processo de calcificação patológico (Viegas et al., 2014). Esta VKDP é ainda expressa nos condrócitos, nos condroblastos, nos osteoblastos e nos osteócitos, podendo ser encontrada nos mamíferos em outros órgãos e tecidos, tais na orelha, no útero e no tecido conjuntivo.

Foi verificado que a GRP tem a capacidade de se ligar com afinidade aos iões cálcio e aos cristais de cálcio e fosfato (Rafael et al., 2014, Viegas et al., 2008) e que se acumula em locais de calcificação ectópica (Viegas et al., 2014).

A GRP está associada a várias doenças associadas à calcificação ectópica tais como dermatomiosite, pseudoxantoma elástico, doença renal crónica (CKD) (Rafael et al., 2014).

Estudos recentes comprovam que a GRP carboxilada (cGRP) assim como a forma não gamacarboxilada (ucGRP) têm a capacidade de se ligar ao mineral BCP e podem ser detetadas em tecidos de indivíduos saudáveis. No entanto, em patologias como a osteoartrite e a calcificação vascular a forma predominante encontrada acumulada nos tecidos é a forma não carboxilada. Assim, a GRP parece desempenhar um papel crucial na regulação da mineralização, podendo ser afetada pelos baixos níveis de vitamina K, uma vez que esta é substrato da carboxilase- $\gamma$  (Viegas et al., 2015, Viegas et al., 2014).

Em estudos utilizando um modelo *ex vivo* de calcificação vascular, a cGRP mostrou ser capaz de inibir a calcificação de forma mais eficiente do que a ucGRP (forma predominante encontrada associada ao mineral em aortas humanas) (Viegas et al., 2015).

Em suma, a GRP é considerada como um potencial inibidor da VC influenciando a formação de mineral, devido à presença de resíduos Gla com grande afinidade para se ligar ao cálcio solúvel e na forma de mineral (Viegas et al., 2015, Viegas et al., 2014).

Estudos recentes no modelo vascular *ex vivo* descrevem a possível associação da GRP a um complexo contendo MGP e fetA detetado em associação com locais de mineralização (Viegas et al., 2015). A GRP foi igualmente descrita como fazendo parte dos exosomas produzidos por fragmentos de artéria aorta em cultura, em conjunto com a MGP e a fetA. Em condições de mineralização foi ainda confirmada a diminuição destes inibidores nestas vesículas em simultâneo com o aumento nos seus níveis de cálcio (Viegas et al., 2015).

#### **I.1.7.4. Proteína Fetuina-A**

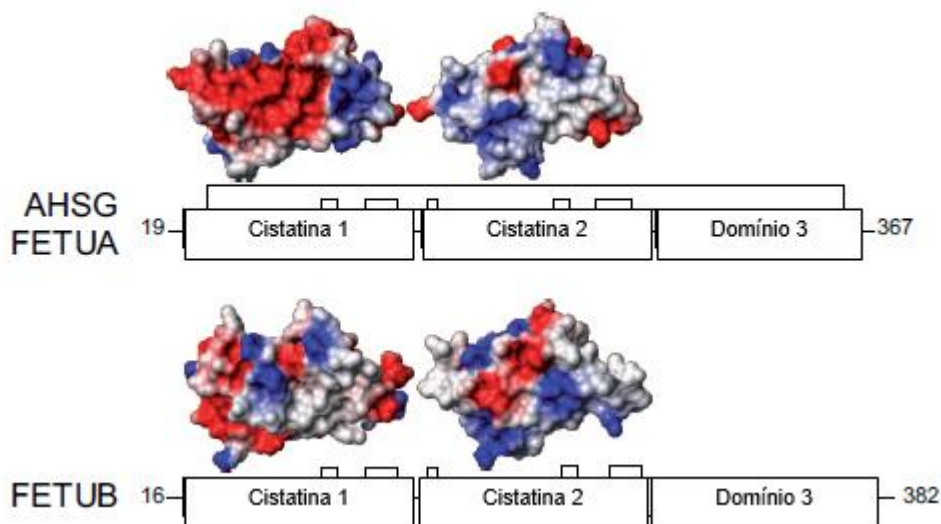
A fetA é uma glicoproteína parcialmente fosforilada e está, geralmente, presente em altos níveis em circulação (Paloian and Giachelli, 2014, Smith et al., 2013a, Smith et al., 2013b), sendo que 7-12% da mesma sofre, maioritariamente, fosforilação da Serina (Ser) 312, seguindo-se a Ser120. No entanto, existem outras serinas que são alvo de fosforilação, tais como a Ser134, Ser138, Ser325, Ser 33 (Smith et al., 2013a).

Esta glicoproteína é secretada, glicosilada e produzida ao nível do fígado (Dautova et al., 2014, Smith et al., 2013a, Jahnen-Dechent et al., 2011) é também conhecida por  $\alpha_2$ -Heremans Schmid glicoprotein (AHSG) (Jahnen-Dechent et al., 2011). No entanto, outros órgãos/estruturas fisiológicas,

como a língua, a placenta e o tecido adiposo, são capazes de expressar, uma vez que possuem o gene que a codifica (Robinson e Teran-Garcia, 2016).

A família fetuina é composta essencialmente por duas proteínas: fetA e fetuina-B (fetB). FetB também é produzida no fígado e tem um papel mais preponderante na fertilização. Ambas pertencem à superfamília Cistatina, inibidores de proteases (Dautova et al., 2014, Jahnen-Dechent et al., 2011). Esta família divide-se em 3 tipos, pertencendo ao tipo 1 as proteínas intracelulares, ao tipo 2 as proteínas extracelulares, e ao tipo 3 as proteínas plasmáticas, que é o caso da fetA e fetB. (Jahnen-Dechent et al., 2011)

A fetA e as suas isoformas possuem um precursor de cadeia única, clivado pelo complexo de *Golgi*, formando duas cadeias distintas, uma com 321 resíduos que sofre um clivagem no seu C-terminal, e outra com 27 aminoácidos. As duas cadeias ligam-se por 6 pontes dissulfureto. A forma madura da fetA possui 3 domínios, com funções diferentes, dois deles estruturalmente relacionados com os domínios 1 e 2 da Cistatina (**Figura I.2**) (Jahnen-Dechent et al., 2011). Sendo o domínio 1 (D1) responsável pela ligação ao cálcio, visto ser rico em resíduos ácido, aos quais os cristais se irão ligar, preferencialmente. O domínio 2 (D2) possui 3 locais de glicosilação distintos e um de fosforilação na Ser120, sendo estruturalmente semelhante à tirosina cinase, inibindo a função desta. Por último, o domínio 3 (D3) possui local de fosforilação na Ser312. A fosforilação é essencial à ativação da fetA (Robinson e Teran-Garcia, 2016).



**Figura I.2 - Esquematização Estrutural da FetA e FetB e seus Domínios Relacionados.** Domínios cistatina com carga negativa, a vermelho, e com carga positiva, a azul. O domínio 1 da fetA é rico em resíduos ácido que conferem a possibilidade de esta se ligar ao fosfato de cálcio. Adaptado de (Jahnen-Dechent et al., 2011).

A fetA é um antagonista das funções desempenhadas pelo TGF- $\beta$  e pela BMP-2 (Jahnen-Dechent et al., 2011). E é considerada como *mineral chaperone* na doença cardiovascular (CVD – *Cardiovascular Disease*), função comprovada pelos seus locais favoráveis à ligação ao fosfato de cálcio, como descrito anteriormente (Robinson e Teran-Garcia, 2016, Jahnen-Dechent et al., 2011).

A FetA liga-se e/ou sequestra núcleos de minerais insolúveis inibindo desta forma o crescimento e a consequente agregação de cristais minerais (Smith et al., 2013a). A fetA contribui para a regulação da mineralização da ECM e na inibição do mecanismo da VC.

Estudos comprovaram ainda que se encontra envolvida na prevenção da calcificação ectópica (Jahnen-Dechent et al., 2011) e que ao mesmo tempo é capaz de minimizar os danos causados pelo fosfato de cálcio, na medida em que inibe a formação de HA (Holt e Smith, 2016, Smith et al., 2013a, Komaba e Fukagawa, 2009).

A FetA que circula é necessária para prevenir a calcificação, como foi demonstrado em ratos que não possuíam a fetA em circulação apresentando estes um aumento da extensão da área dos tecidos afetados pela calcificação (Dautova et al., 2014, , Smith et al., 2013b, Komaba e Fukagawa, 2009). A afinidade da fetA pelas nanopartículas de CaP altera a interação destas partículas com a superfície das células, uma vez que estas partículas estarão menos disponíveis para interagir e consequentemente causarão menos danos celulares (Dautova et al., 2014).

No entanto se a fetA não estiver presente em concentração adequada as partículas de CaP são ainda capazes de induzir danos na membrana plasmática. Estudos comprovaram que a adição de fetA numa concentração  $\geq 1 \mu\text{M}$  permitiu a proteção contra os danos celulares causados. Ou seja, para níveis de fetA reduzidos esta poderá não exercer mais o seu efeito protetor sobre a célula, permitindo mesmo a morte celular por apoptose (Dautova et al., 2014).

Os níveis de fetA presentes no organismo são mais elevados na infância, declinam durante a adolescência e oscilam, fortemente, na fase adulta. Também fatores comportamentais como dieta, com restrições calóricas, prática de exercício físico aeróbio e operações para perda de peso diminuem estes valores (Robinson e Teran-Garcia, 2016).

Em suma, a fetA representa 25% das proteínas não-colagénicas e tem uma atividade *anti-calcifying*, ligando-se aos novos cristais formados e impedindo a calcificação *de novo* (Holt e Smith, 2016, Dautova et al., 2014). Esta proteína não exerce efeito na calcificação pré-existente, ou seja, apenas impende a sua progressão.

#### **I.1.7.5. Relação entre Fetuina-A e Partículas de Calciproteína/Complexos Mineral - Fetuina- A**

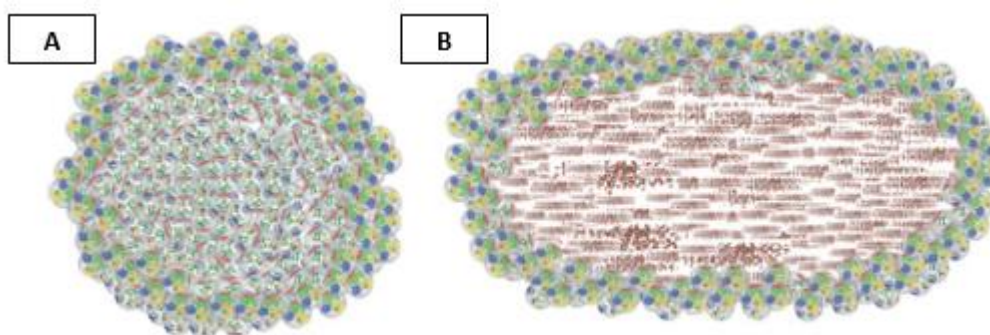
Sabe-se que muitas doenças estão associadas à deposição ectópica de mineral cristalino, em particular no sistema vascular.

O tamanho dos cristais influencia a sua capacidade de causar patologias, ou seja, ao seu tamanho está associada a sua capacidade de induzir inflamação e morte celulares. Em alguns estudos o isolamento de cristais, em placas de arteriosclerose, mostrou que os mesmos variavam entre 50nm e 8 $\mu\text{m}$ . No entanto nas VSMCS cristais com tamanhos na ordem dos 1-2 $\mu\text{m}$  já induziam resposta inflamatória. O tamanho é importante na inflamação mas existem outras propriedades que influenciam a intensidade de resposta tal como a forma dos cristais, tendo um estudo prévio comprovado que cristais em formato de agulha também são proinflamatórios (Smith et al., 2013a).

A fetA através de D1 liga-se e sequestra núcleos insolúveis de mineral, não permitindo a precipitação de fosfato de cálcio na sua forma cristalina, HA, dando origem a partículas solúveis de calciproteína (Aghagolzadeh et al., 2016), designadas de CPPs ou por FMCs (Price e Lim, 2003).

Estudos anteriores comprovaram que na presença de CPPs/FMCs a eliminação dos nanocristais em circulação, pelas células fagocíticas, é facilitada. Com a eliminação facilitada dos FMCs da corrente sanguínea previne-se a calcificação extraóssea entre outros problemas patológicos associados aos cristais de HA, desde que exista um equilíbrio entre a formação destes CPPs/FMCs e a sua correta eliminação da circulação (Smith et al., 2013a).

Estas nanopartículas apresentam diferentes estádios de maturação. Existem as CPPs primárias (CPP1s) constituídas por fetA e mineral mais amorfo, tendo por isso uma forma mais arredonda. E existem as CPPs secundárias (CPP2s) com uma forma mais alongada, lembrando agulhas, que contêm cristais de HA bem definidos (**Figura I.3**). No entanto existem estádios intermédios de maturação nos quais se dão mudanças graduais no diâmetro das partículas, na sua forma e na sua constituição (Aghagolzadeh et al., 2016, Pasch et al., 2012, Jahnen-Dechent et al., 2011).



**Figura I.3 - Esquematização da Maturação das CPPs/FMCs. A – CPP1, material mais amorfo no interior, rodeado de fetA. Forma mais esférica. B – CPP2, cálcio e fosfato na sua forma cristalina. Forma-se uma monocamada compacta de fetA em torno do mineral. Forma mais alongada. Estádio mais avançado da maturação. Adaptado de (Jahnen-Dechent et al., 2011).**

Embora as CPPs que contenham fetA associada sejam responsáveis pela estabilização das partículas de cálcio-fosfato (Dautova et al., 2014) e que impeçam o seu crescimento e agregação podem desempenhar um papel patogénico na VC. Estas nanopartículas circulantes quando em grande número ou quando a sua eliminação da corrente sanguínea é inferior à sua formação são responsáveis por graves danos celulares, tais como *stress* oxidativo e aumento da resposta inflamatória. A internalização das CPPs pelas células pode ocorrer de três formas distintas, via macropinocitose; por invaginação da membrana ou por danos pontuais na membrana plasmática (Dautova et al., 2014).

Smith et al. elaboraram um estudo que consistiu na comparação do efeito entre CPPs biológicas contendo fetA e cristais sintéticos de HA e verificaram que estes últimos são mais agressivos no processo inflamatório celular. Os cristais sintéticos são mais nocivos que as CPPs biológicas, pois as CPPs contêm outras proteínas modeladoras da calcificação que não estão presentes nos cristais obtidos sinteticamente (Dautova et al., 2014, Smith et al., 2013a).

Estudos recentes permitiram concluir que são as CPP2s que induzem a calcificação das VSMCs, e que as CPP1 não desempenham esse papel. Tal situação poderá dever-se à componente amorfa e não cristalina de fosfato de cálcio presente nas CPP1, aos seus baixos teores em CaP, à quantidade de proteína presente, à sua composição proteica, à razão entre o mineral e a proteína, ao tamanho e forma das nanopartículas e/ou à combinação de todas estas propriedades (Aghagolzadeh et al., 2016).

Em conclusão, embora a elevados níveis de CPPs se possa associar um aumento da VC, as CPPs contendo fetA são menos proinflamatórias que as partículas de CaP sem proteínas associadas ou de origem sintética (BCPs sintéticos) (Jahnen-Dechent et al., 2011). As CPPs geralmente têm um efeito protetor contra a toxicidade celular e representam uma importante resposta de defesa humoral do organismo (Smith et al., 2013a, Dautova et al., 2014) quando a sua formação e respetiva eliminação da corrente sanguínea estão em homeostasia. Quando existe uma desregulação entre a formação de CPPs e a sua correta eliminação da corrente sanguínea estas acabam por desempenhar um papel patogénico.

#### **I.1.8. Terapêutica na Calcificação Vascular**

A VC é um processo fortemente regulado, embora tenha uma componente passiva que diz respeito à deposição de HA. A terapêutica pode intervir em vários pontos dos seus processos ativo e passivo e passa também pela tentativa de inibir a progressão da VC. No entanto, não existe uma terapia funcional que trate diretamente esta condição (Lee, 2011). A terapêutica existente trata intervenientes ou metabolismos associados a este processo de calcificação.

A FetA pode funcionar como biomarcador, conseguindo a sua monitorização dar-nos uma avaliação do nível de VC, do processo inflamatório em doentes com CKD e com doença cardiovascular (Holt e Smith, 2016, Lee, 2011).

A proteína C reativa (CRP) é conhecida como uma proteína sinalizadora da progressão da calcificação em doentes em diálise, podendo a deteção dos seus níveis indicar inflamação crónica presente (Lee, 2011).

Desenvolvimentos no ramo da Engenharia de células e tecidos poderão desenvolver terapias baseadas em modeladores biológicos da VC, como a MGP e GRP. Sendo uma abordagem futura com forte potencial (Lee, 2011).

Alguns autores mencionam as/os CPPs/FMCs como boas/bons ferramentas de monitorização e como potenciais marcadores e terapêutica da VC. Pois como o próprio nome indica são estruturas contendo cálcio complexado com proteínas como a FetA (Paloian e Giachelli, 2014).

Estudos verificaram que os níveis de magnésio podem substituir o cálcio na sua ligação com HA e que o magnésio aumenta a solubilidade de HA. Também foi demonstrado que o magnésio inibe a transformação das VSMCs em células idênticas a osteoblastos (Lu et al., 2014).

Sabe-se que agentes que se ligam ao fosfato podem diminuir os seus níveis em circulação e adequá-los às tarefas fisiológicas sem desempenharem um papel determinante na patologia. A hiperfosfatemia é uma situação a evitar, sendo portanto um alvo principal da terapêutica (Paloian e Giachelli, 2014).

Vários tratamentos capazes de reduzir a absorção intestinal de fosfato abrangem os agentes que se ligam ao fosfato e uma dieta de baixo teor em fosfato (Lu et al., 2014, Paloian e Giachelli, 2014). Existem dois tipos de agentes que se ligam ao fosfato, os que contêm cálcio na sua composição e os livres de cálcio, em que este não se encontra presente. Pensa-se que só os que contêm cálcio são capazes de contribuir para a VC e para o crescimento mineral. Estudos provaram que estes agentes de ligação ao fosfato, em doentes com CKD de alto risco, poderão ser usados contra a VC (Lu et al., 2014).

Agonistas do Recetor da Vitamina D são dados a doentes com CKD e aumentam muitas vezes o seu tempo de vida. No entanto o mecanismo pelo qual o fazem permanece por esclarecer. Em estudos em animais verificou-se que estes agonistas desempenham um papel importante na diminuição da calcificação da artéria aorta, uma vez que aumentam os níveis de osteopontina, proteína também conhecida como modeladora da VC (Lu et al., 2014).

Calcimiméticos assim designados por mimetizarem o efeito da presença de cálcio ligam-se aos recetores sensíveis a cálcio, os CaSRs, diminuindo os níveis de CaP no soro. Os CaSRs quando ligados a calcimiméticos ficam mais sensíveis a elevações séricas destes iões. Estudos em humanos e animais provaram que a administração destes compostos contribuem para a redução da VC (Lu et al., 2014).

Outros intervenientes tais como tiosulfato de sódio, bisfosfanatos e a deficiência em zinco são importantes na VC. O tiosulfato de sódio atua como vasodilatador, antioxidante e como agente quelante de cálcio. Aumenta assim a correta circulação e reduz a inflamação dos tecidos adjacentes. Os bisfosfanatos são importantes na redução da reabsorção óssea e poderão inibir a ação dos osteoclastos, reduzir os níveis de CaP e bloquear a nucleação da HA. A deficiência em zinco tem de ser evitada uma vez que o seu défice compromete a viabilidade das VSMCs (Lu et al., 2014).

Os exossomas poderão ser utilizados como ferramenta de entrega de fármacos a células-alvo. São estruturas ideais para este tipo de terapêutica devido ao seu tamanho e à sua capacidade de atravessar membranas e de se fundirem com as mesmas. A entrega de drogas farmacológicas pelos exossomas é facilitada ainda devido a estes terem na sua constituição uma bicamada de lípidos que os protege contra a ação de proteínas da degradação, de mRNA e de miRNA (Fang et al., 2013).

No interior dos exossomas podem ser inseridas moléculas necessárias ao bom funcionamento das suas células-alvo e também podem conter RNAs de interferência. Segundo alguns estudos se o alvo forem as células estaminais do mesênquima poderão ser tratadas doenças renais através da utilização de exossomas (Fang et al., 2013).

No entanto, o ponto-chave da terapia para a VC acarreta o metabolismo do osso. Sendo necessário tentar manter o equilíbrio entre a sua formação e reabsorção. O ideal e necessário é a terapêutica da VC ser dirigida de forma individual, uma vez que os doentes com CKD apresentam diferentes problemas no metabolismo do osso.



## **I.2. Microscopia Eletrônica ou EM**

A microscopia é o estudo que permite a formação de imagens ampliadas de objetos de interesse. Os microscópios são capazes de produzir uma imagem aumentada de um objeto de dimensões não inferiores ao limite de resolução do olho humano. O mais conhecido é o microscópio de luz visível (Egerton, 2005).

O limite de resolução é a distância mínima necessária para que sejamos capazes de distinguir dois pontos próximos. O limite de resolução do microscópio de luz visível é de 200nm enquanto o microscópio eletrônico tem um limite de resolução de 0,2nm. O microscópio eletrônico permite visualizar objetos de dimensões inferiores ao limite de resolução do microscópio de luz (Egerton, 2005).

Na presente dissertação foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica para visualizar estruturas morfológicas características da VC, tais como os FMCs, os cristais de HA, as MVs e ainda para imunodeteção de proteínas modeladoras da VC por anticorpos acoplados a nanopartículas de ouro. Serão abordadas as técnicas SEM, TEM e Imunodeteção em TEM.

### **I.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão ou TEM**

Ernst Ruska, em 1931, conseguiu a primeira imagem de microscopia de transmissão de uma grelha de metal, através da utilização de duas lentes. Essas duas lentes eram bobinas condutoras de corrente elétrica que produziam um campo eletromagnético. Posteriormente acrescentou uma terceira lente e com este conjunto conseguiu obter imagens de fibras de algodão em tudo melhores que as obtidas por microscopia óptica, com melhor resolução (Egerton, 2005).

As lentes tinham de estar alinhadas com o eixo óptico na horizontal. A horizontalidade não permitia um tão bom alinhamento das lentes com o eixo (Egerton, 2005).

Em 1936 iniciaram-se esforços para a produção de um primeiro TEM. Contudo só em 1938 foi produzido o primeiro com um poder de resolução de 10nm (Egerton, 2005).

O TEM é capaz de ampliar imagens na ordem  $10^3$  a  $10^6$  e pode ser usado para obtenção de padrões de difração, úteis quando se analisam amostras que apresentam estruturas cristalinas (Egerton, 2005).

O TEM é constituído por um canhão de elétrons que produz um feixe e por um conjunto de lentes magnéticas dispostas verticalmente.

Em TEM os elétrons da fonte de energia penetram na amostra a observar, que se encontra no porta-amostras, e através dum conjunto de lentes forma-se uma imagem visível e ampliada. A amostra tem de ser fina com espessura na ordem dos 50-90 nm (Egerton, 2005).

Existem três sistemas que constituem este tipo de microscópio, o sistema de iluminação, o sistema de suporte da amostra e o sistema de imagem. O primeiro é composto pelo canhão de elétrons e por duas ou mais lentes que dirigem o feixe de elétrons até à amostra a analisar. O sistema de suporte da amostra permite que a amostra se mantenha resguardada e fixa no local. Geralmente a amostra é adsorvida ou colocada numa grelha e esta é colocada no porta-amostras (sistema de suporte) que é removível do microscópio. O último sistema, o sistema de imagem, compreende pelo menos três lentes que produzem uma imagem ampliada num ecrã fluorescente e/ou num ecrã de um computador após

aquisição da fotografia por uma máquina digital. Antigamente a máquina fotográfica era de formato analógico e a imagem era revelada em papel fotográfico (Egerton, 2005).

Através de energia cinética o canhão permite que os elétrons atravessem e penetrem na amostra. O canhão de elétrons é composto pela fonte de energia, o cátodo, e pela câmara de aceleração de elétrons.

A fonte de elétrons pode ser termiônica, originando emissão de elétrons na coluna de vácuo, por aquecimento do filamento de tungstênio. O hexaboreto de lantânio também pode ser utilizado como fonte.

O TEM é ainda composto por um cilindro de *Wehnelt* que ladeia o filamento. Existe uma abertura minúscula para a passagem do feixe de elétrons (Egerton, 2005).

Os elétrons são emitidos do cátodo até ao ânodo, ao longo de um campo elétrico. Nesse percurso os elétrons sofrem um aceleração. O ânodo tem a forma de um disco/prato com um orifício axial e é carregado positivamente em relação ao cátodo. Apenas 1% dos elétrons acelerados passam pelo orifício do ânodo. Os outros cerca de 99% ficam no prato do ânodo não passando pelo orifício (Egerton, 2005).

O sistema de iluminação é composto por duas ou mais lentes. A primeira lente condensadora encontrada é fortemente magnética e a segunda é um pouco mais fraca. Possui também astigmatadores para correção do astigmatismo do feixe de elétrons (Egerton, 2005).

O sistema de suporte da amostra ou sistema de fase móvel da amostra permite que a amostra se mantenha o mais estável e fixa possível numa ranhura para o efeito que não possui mais de 3mm de diâmetro. Este porta amostras ou suporte de amostra é inserido numa câmara apropriada na coluna do TEM, acima da lente objetiva (Egerton, 2005).

O sistema de imagem em TEM é constituído por duas ou mais lentes responsáveis pela ampliação da imagem ou pelo padrão de difração obtido e característico da amostra a analisar. A resolução depende deste conjunto de lentes e cada microscópio contém uma objetiva, duas ou três lentes intermediárias e uma lente projetora. A lente objetiva é geralmente de curta distância focal e produz uma imagem ampliada da imagem real. Essa imagem só será bem focada se a corrente que passa pelas lentes estiver estabilizada. Também para este tipo de lente existe um astigmador (Egerton, 2005).

As lentes intermediárias encontram-se entre as lentes objetivas e a lente projetora. Todas as lentes trabalham em uníssono e de forma orquestrada para que a ampliação possa ser alterada de forma gradual, com alguma facilidade (Egerton, 2005).

Por fim, a lente projetora permite que imagem ampliada possa ser visível no ecrã fluorescente. Essa imagem pode depois ser captada por uma máquina analógica e revelada ou ser adquirida por uma máquina fotográfica digital e ser registada de forma permanente através de um sistema digital como o computador (Egerton, 2005).

Tal como no SEM existe uma coluna sob alto vácuo que opera sobre os mesmos princípios e tem como principal finalidade impedir a colisão dos elétrons do feixe com átomos gasosos e a sua pressão é da ordem dos  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  Pa (Egerton, 2005).

Para TEM são necessárias secções ultrafinas da amostra que são colocadas sobre grelhas e inseridas no porta-amostras para visualização. No entanto amostras líquidas são adsorvidas às grelhas cobertas por carbono e contrastadas com um agente de contraste para que se possam ver as diferentes estruturas presentes na amostra. As amostras são secas ao ar ou na coluna de vácuo antes de serem visualizadas (Egerton, 2005).

Esta técnica permite distinguir morfologicamente diferentes estruturas por diferença de densidade. Na presente dissertação foi utilizada com o intuito de se proceder à caracterização morfológica de FMCs biológicos, sintéticos e de cortes de tecidos de fragmentos da aorta.

#### **I.2.1.1. Imunodeteção Acoplada a Partículas de Ouro em TEM**

A Imunodeteção em microscopia eletrónica é uma técnica emergente da necessidade de fazer a ligação entre informações de cariz bioquímico, molecular, biológico e ultraestrutural (Paul A. L. et al., 2012).

Trata-se de um dos melhores métodos para detetar e localizar antigénios como proteínas celulares e as que se encontram presentes nos tecidos a estudar (Paul A. L. et al., 2012, Hagiwara et al., 2010).

O seu princípio chave baseia-se na utilização de um anticorpo específico para antigénios presentes na amostra. A localização do anticorpo é revelada por nanopartículas de ouro que em regra se ligam a anticorpos secundários, anti-anticorpo primário (Hagiwara et al., 2010). O ouro é usado desde 1971 como marcador para microscopia (Paul A. L. et al., 2012).

A conjugação com nanopartículas de ouro permite uma boa resolução. E a utilização de nanopartículas ligadas a anticorpos diferentes permite a deteção de múltiplos antigénios (Paul A. L. et al., 2012).

No entanto a imunodeteção está dependente de inúmeros fatores, nomeadamente da preservação da antigenicidade das proteínas que se pretendem detetar, da capacidade dos anticorpos selecionados serem capazes de ultrapassar as barreiras celulares, quando existem, e de reconhecer com alta especificidade o seu antigénio (Paul A. L. et al., 2012, Hagiwara et al., 2010).

A imunodeteção com anticorpos conjugados com partículas de ouro, como mencionado, é um método preferencial para deteção porque os complexos de ouro têm imensas vantagens, devido à sua densidade eletrónica, permitindo a sua fácil identificação nas imagens de TEM obtidas (Bleher et al., 2008).

As nanopartículas podem ter diferentes tamanhos, o que permite a sua distinção em EM (Hagiwara et al., 2010). O diâmetro mais usual para estas partículas varia entre 5 a 25nm (Paul A. L. et al., 2012). Em suma, podem ser detetados diferentes antigénios em simultâneo se forem utilizados anticorpos secundários diferentes conjugados com nanopartículas de ouro de tamanhos distintos (Bleher et al., 2008).

Existem inúmeros protocolos para imunodeteção em microscopia eletrónica, quase todos eles para cortes em resina. No entanto, na presente dissertação foi otimizado um protocolo para imunodeteção em TEM para suspensões que, após a sua adsorção à grelha são visualizadas. Esse protocolo encontra-se na em “Anexos”.

O protocolo tem de ser adequado aos anticorpos e às amostras a estudar, pelo que não há um protocolo fixo, podendo sofrer as alterações necessárias após vários testes (Thery et al., 2006). No entanto, existem algumas regras na elaboração de um ensaio de imunodeteção. São sempre necessários controlos aos anticorpos utilizados para que seja possível concluir quanto à especificidade de cada um. O controlo mais adequado diz respeito à omissão da utilização do anticorpo primário, substituindo-o pelo tampão. Esta omissão permitirá uma avaliação no que concerne à marcação pelos anticorpos, podendo verificar-se se os anticorpos estão a marcar especificamente o antígeno que se pretende (Paul A. L. et al., 2012).

A imunodeteção pode ser simples, dupla ou tripla, designando-se estas duas últimas de colocizações. Nestas situações em que são utilizados vários anticorpos é necessário que as partículas de ouro tenham tamanhos distintos (Paul A. L. et al., 2012).

O diâmetro das nanopartículas afeta a densidade da marcação levada a cabo pelas mesmas. A combinação mais adequada de diâmetros é aquela em que são usadas partículas com 5 e 10nm de diâmetro, uma vez que se conseguem distinguir com alguma facilidade para obtenção de melhores resultados no que diz respeito à resolução (Hagiwara et al., 2010). Contudo existem desvantagens no que diz respeito à utilização de diferentes tamanhos das esferas de ouro coloidal, uma vez que partículas de diâmetro maior podem mascarar a marcação dos anticorpos conjugados com as partículas de diâmetro mais pequeno ou até mesmo bloquear a ligação destes anticorpos aos seus antígenos (Bleher et al., 2008).

Uma alternativa ao sistema de utilização de nanoesferas de ouro com diferentes diâmetros é a conjugação com partículas de diferentes formas, ou seja, a sua forma em vez de esférica poderia ser piramidal, por exemplo. E em colocizações estas nanopartículas de formas diferentes poderiam ser usadas e conjugadas com anticorpos que detetassem antígenos diferentes na mesma amostra (Bleher et al., 2008).

### **I.2.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento ou SEM**

Os microscópios eletrónicos de varrimento (SEM) são hoje em dia os mais utilizados no campo da microscopia eletrónica.

O SEM só começou a ser utilizado a partir dos anos 70-80, tendo sido construído um SEM com 10nm de resolução. Em 1965 o primeiro SEM foi comercializado (Stokes, 2008).

Estes microscópios eletrónicos atingiram popularidade devido à sua capacidade de obtenção de imagens esteticamente atraentes das superfícies da amostra, sendo visível o relevo dos materiais a observar (Stokes, 2008).

Em SEM a existência de alto vácuo no interior da coluna é crucial. São necessárias condições de alto vácuo por forma a minimizar a dispersão dos eletrões primários na coluna. O feixe de eletrões é assim fortemente direcionado para a amostra a observar. O vácuo também é importante para que a fonte de eletrões não sofra contaminação e para que não existam perdas de eletrões dispersos (Stokes, 2008).

O SEM bombardeia a amostra com eletrões com alta energia criando uma elevada carga negativa em torno da amostra. A amostra tem de ser condutora para que haja dissipação dessas

cargas. Nos casos em que as amostras não são condutoras é necessário conferir-lhes propriedades de condutividade. Quando não há condutividade não se dá uma acumulação de carga e então existe uma distorção de campos próximos da amostra. A distorção de campos pode levar à criação de artefactos e a uma obtenção medíocre de imagens. Muitas vezes amostras com baixa condutividade ou sem condutividade elétrica têm de ser cobertas por evaporação de metais, tais como ouro, crómio, paládio ou platina. No entanto, este revestimento por vezes pode ocultar detalhes da amostra (Stokes, 2008).

Como foi mencionado, são os eletrões os responsáveis pelo sinal obtido. Os eletrões que constituem a sonda que irradia a amostra são designados de primários.

Os eletrões ao atingirem a superfície da amostra originam diferentes tipos de sinais. Assim existe o sinal produzido pelos eletrões retrodifundidos, em inglês *backscattered electrons* (BSE), e o sinal produzido pelos eletrões secundários que são os dois sinais mais usados em SEM. Estes sinais são originados quando os eletrões primários atingem a superfície da amostra e perdem energia. Os BSEs são os eletrões primários cuja trajetória foi alterada por deflexão devido à colisão com os átomos da amostra. Os eletrões secundários provêm de colisões inelásticas, transferindo parte da sua energia aos eletrões dos átomos da amostra. São precisos detetores acoplados ao SEM para que os eletrões destes dois tipos sejam captados, permitindo obter uma imagem topográfica da amostra (Stokes, 2008).

As radiações X são emitidas quando os átomos excitados relaxam até ao seu estado fundamental de energia. Este tipo de radiação é importante para determinar a composição química elementar da amostra. A esta determinação elementar dá-se o nome de microanálise. A microanálise mais conhecida e utilizada designa-se por Espetroscopia de Raio X de Energia Dispersiva, EDX ou EDS. Outra forma de microanálise é por deteção de comprimento de onda (WDS) (Stokes, 2008).

Sucintamente, o SEM é constituído por uma fonte de eletrões, lentes, bobinas de varrimento do feixe, sistemas de alta voltagem e controlo elétrico, monitor para visualização da informação conseguida, coluna de vácuo e por uma câmara para colocação da amostra a observar (Stokes, 2008). A pressão do vácuo no SEM ronda os  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  Pa dependendo da sua fonte de eletrões e sistema de vácuo. A fonte de eletrões responsável pela produção do feixe de eletrões provém de um filamento tungsténio ou LaB6 (hexaboreto de lantânio) nas fontes termiónicas. Este tipo de fonte designa-se de termiónica porque é aquecida para que ocorra libertação de eletrões. No entanto existem as fontes de emissão de campo em que os eletrões são arrancados à ponta do emissor por um campo eletromagnético aplicado. Este tipo de fonte é mais sujeita a contaminações e requer maior vácuo que as fontes termiónicas (Stokes, 2008).

No que diz respeito às lentes destes microscópios estas são eletromagnéticas e convergentes. Responsáveis por focar o feixe de eletrões incidente na amostra, que passa através delas.

A informação obtida por SEM é posteriormente convertida em imagens, espetros e mapas de fácil análise (Stokes, 2008, Egerton, 2005).

### **I.3. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier ou FTIR**

FTIR tem-se mostrado útil no que diz respeito à análise de amostras biológicas. Permite-nos obter um espectro com bandas características das vibrações provenientes das ligações químicas e às quais correspondem diferentes frequências de infravermelhos.

Cada biomolécula tem um comportamento vibracional diferente, como se essas vibrações dadas pelos grupos funcionais fossem impressões digitais.

Os ácidos nucleicos, os carboidratos e os lípidos têm grupos funcionais característicos tendo por conseguinte vibrações específicas que os caracterizam (D'Souza et al., 2008). Também as proteínas e a fase mineral possuem vibrações identificáveis e características (Sauer e Wuthier, 1988).

Este tipo de espectroscopia é caracterizado por ter informação importante sobre a localização dos picos, a que corresponde uma maior frequência de radiação infravermelha. A intensidade, o tamanho e a forma dos picos numa dada banda caracterizam determinado grupo funcional ou ligação (Berzina-Cimdina, 2012).

Existem tabelas na literatura onde se encontram relacionadas determinadas bandas obtidas do espectro FTIR com os grupos/ligações. Como tal, existe informação referente às bandas de absorção dos grupos químicos da fase rica em fosfato de cálcio (Berzina-Cimdina, 2012).

A HA é a fase mineral predominante nos vertebrados. E os grupos que a caracterizam, quando sintetizada, são maioritariamente  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , sendo respetivamente, fosfato, hidróxido e carbonato (Berzina-Cimdina, 2012). Através das bandas no espectro FTIR podemos concluir se existe ou não HA, ou até de algum tipo de CaP amorfo, desde que se consigam identificar grupos característicos presentes no espectro.

O fosfato apresenta bandas de absorção no Infravermelho a  $560$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ , e a  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ . E o carbonato tem o seu pico mais fraco entre  $870\text{-}880\text{ cm}^{-1}$  e o mais intenso entre  $1460\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$  (Berzina-Cimdina, 2012).

### **I.4. Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente ou ICP-AES**

A ICP-AES é considerada uma técnica de deteção e quantificação de elementos, sendo bastante sensível e de eficiência elevada. Baseia-se na espectrometria atômica, ou seja, assenta na emissão de energia, em determinado comprimento de onda, por átomos excitados quando estes retornam ao seu estado fundamental de energia com emissão de fotões.

Segundo as suas características químicas cada elemento emite energia com um comprimento de onda específico e a sua intensidade energética é diretamente proporcional à concentração desse elemento na amostra a analisar, permitindo assim saber-se a quantidade presente de cálcio e fósforo na amostra, por exemplo (Vallapragada et al., 2011).

As amostras no estado líquido são injetadas no aparelho, mas as amostras sólidas necessitam de um pré-tratamento, sendo previamente digeridas com uma solução ácida para que possam passar a estado líquido. Após a inserção da amostra, a mesma é convertida em aerossol. O aerossol formado no canal central do plasma é volatilizado de forma rápida devido à temperatura na ordem dos  $10000\text{ K}$ ,

levando à libertação de átomos livres que consequentemente colidem. Os átomos ficam no estado excitado. A espécie ionizada posteriormente retorna ao seu estado fundamental com emissão de fótons (Hou e Jones, 2000). Ao comprimento de onda é possível associar-se e identificar um dado elemento.

## **I.5. Objetivos**

Com este projeto pretendeu-se caraterizar morfologicamente FMCs biológicos, BCP sintéticos e tecidos de fragmentos de aorta calcificados submetidos a condições indutoras de calcificação, através das técnicas de microscopia eletrónica, SEM e TEM.

Para a concretização destes objetivos principais procedeu-se à:

- 1) Análise morfológica das nanopartículas na presença e ausência das proteínas modeladoras da mineralização, GRP, fetA e MGP;
- 2) Análise morfológica dos fragmentos da aorta em condições mineralizantes e na presença das proteínas rGRP e stGRP, por forma a avaliar o efeito da gamacarboxilação da GRP na mineralização dos tecidos dos fragmentos da aorta;
- 3) Implementação de um protocolo para imunodeteção por TEM de algumas das proteínas presentes nos FMCs sintéticos e biológicos;
- 4) Microanálise por EDS de amostras de FMCs isolados de soros de pacientes controlo e de doentes com CKD;
- 5) Quantificação global por ICP-AES da presença de fósforo e cálcio totais nas amostras de FMCs isolados de soros de doentes com CKD;
- 6) Utilização da espectroscopia de FTIR para caracterização das micro-amostras do mineral confirmando a presença de grupos fosfato associados a cálcio.





## II. Materiais e Métodos

### II.1. Materiais

#### II.1.1. Químicos e Reagentes

Acetato de Uranilo com pureza igual ou superior a 65%, Resina de Polivinil Formal, FORMVAR 15/95E, Araldite, Epon (EMbed812), Azul de Toluidina O, Óxido de Propileno e Tetróxido de Ósmio provêm de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, Pensilvânia). Ácido Nítrico 67% NORMATOM® foi adquirido de Prolabo®. Albumina de Soro Bovino (BSA) com grau de pureza superior a 99% proveio de Calbiochem (Oeiras, Portugal). Cloreto de Sódio com grau de pureza de 99,5%, Fosfato de Sódio Heptahidratado e Cacodilato de sódio foram adquiridos em Panreac AppliChem (Barcelona, Espanha). Cloreto de Potássio com grau de pureza igual ou superior a 99,5%, Gluteraldeído 25% com grau de pureza superior ou igual a 98% e ácido acético provêm de Merck (Algés, Portugal). Agar em pó provêm de VWR (Carnaxide, Portugal). Fosfato de Potássio Monobásico com grau de pureza igual ou superior a 99% e Triton X-100 provêm de Sigma-Aldrich (MO, USA). Glicina com grau de pureza superior a 99,5% foi adquirida de NZYtech (Lisboa, Portugal). Dicloreto de Etileno proveniente de Emplura®.

A solução de *phosphate buffer saline* (PBS) foi feita com reagentes mencionados acima, nomeadamente Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, Fosfato de Potássio Monobásico e Fosfato de Sódio Heptahidratado de acordo com a **tabela A.6** em “Anexos”.

#### II.1.2. Anticorpos para Imunodeteção de GRP, Fetuina-A e MGP em TEM.

Tabela II.1 - Anticorpos Primários Utilizados e Respetiva Informação.

Anticorpo Primário	Desenvolvido em:	Marca	Diluição
Rabbit tGRP (CTerm) (Policlonal)	Coelho	GenoGla	1:20
Mouse tMGP (Monoclonal)	Ratinho	VitaK	1:20
Rabbit Fetuina-A (Policlonal)	Coelho	Biovender	1:40
Mouse Fetuina-A (H-4) (Monoclonal)	Ratinho	Santa Cruz Biotechnology	1:40

Tabela II.2 - Anticorpos Secundários Utilizados e Respetiva Informação.

Anticorpo Secundário	Desenvolvido em:	Marca	Diluição
Anti-Rabbit IgG (molécula inteira) conjugado com Partículas de Ouro 10nm	Coelho	Sigma-Aldrich	1:15
Anti-Mouse IgG (molécula inteira) conjugado com Partículas de Ouro 5nm	Ratinho	Sigma-Aldrich	1:20

### II.1.3. Equipamento

Foi utilizado um microscópio de Varrimento, SEM, modelo Zeiss Auriga CrossBeam system usado para obtenção de imagens de microscopia eletrônica de varrimento, acoplado a este foi usado um sistema/detector EDS, Oxford XMax 150, para microanálise nomeadamente mapeamento e análise pontual de cálcio e fósforo nas amostras analisadas.

O microscópio de transmissão, TEM, modelo JEOL 1200EX foi utilizado na obtenção de imagens de microscopia eletrônica de transmissão respeitantes à morfologia de BCPs, FMCs, cristais de cálcio fosfato e imunodeteção de proteínas modeladoras.

Os espectros de FTIR foram adquiridos num espectrómetro equipado para micro-análise em modo ATR, modelo Nicolet Nexus Continuum para averiguar a presença de espécies de fosfato de cálcio (HA) na amostra. As bandas foram identificadas por comparação com amostras padrão de hidroxiapatite, HA, e BCPs sintéticos.

Utilizou-se um ICP-AES da marca Jobin-Yvon, modelo Ultima de observação radial, equipado com um gerador RF de 40.68 MHz e um monocromador tipo Czerny-Turner de 1.00 m para quantificação de cálcio e fósforo nas amostras.

Foram utilizados outros equipamentos como um medidor de pH, modelo Crison microPH 2000 para medição do pH da solução de PBS preparada; uma minicentrífuga de bancada, Minispin® da Eppendorf; um ultramicrotomo, Ultracut E da Reichert Jung, para obtenção de cortes semifinos e ultrafinos para SEM das amostras de tecido a analisar; um sonicador, Liarre Starsonic 35, para dissolução das amostras tratadas para o ICP-AES; uma centrífuga Eppendorf 580R da Eppendorf para preparação e embebimento das amostras para SEM; uma balança digital Precisa 125A e um microscópio de Luz visível, Leica DMLB com Câmara Leica DFC290HD, para visualização dos cortes seminifinos corados com azul toluidina.

Por último usaram-se grelhas para TEM, 300 Mesch-Cu (Electron Microscopy Sciences), que foram cobertas por membrana de *formvar* e carbono. Este último depositado pelo aparelho de evaporador de vácuo JEOL JEE-400 segundo o “protocolo A.2” em “Anexos”.

## II.2. Métodos

### II.2.1. Cultura de Tecidos de Cortes Histológicos de Fragmentos da Aorta e Recolha das Amostras

Os tecidos cultivados provenientes dos fragmentos de aorta foram obtidos e processados como previamente descrito, com adição das proteínas modeladoras da VC (Viegas et al., 2015).

A nossa análise foi feita não após recolha das amostras (Kapustin et al., 2011) mas após cultura de tecidos.

Sumariamente, as recolhas foram feitas ao longo do tempo de forma a avaliar-se a evolução da VC. Procederam-se a três recolhas dos tecidos em cultura. O Tempo 1 refere-se à primeira recolha após 4 dias em cultura. O Tempo 2 diz respeito à segunda recolha para análise passados mais 4 dias em cultura e o Tempo 3 é referente à última recolha, num total e ao longo de 13 dias.

Os fragmentos de aorta cultivados foram expostos a distintas condições de cultura. Assim, a cultura de tecidos compreendeu as condições:

- Controlo (CTR) referente à situação em que os tecidos foram deixados em meio de cultura normal;
- Meio Mineralizante (MM) referente à adição de fosfato de cálcio ao meio de cultura por forma a induzir a mineralização da matriz;
- stGRP em que o MM foi suplementado com proteína stGRP;
- rGRP em que o MM foi suplementado com proteína rGRP.

Em cultura a histologia dos tecidos foi mantida (Viegas et al., 2015).

## **II.2.2. Fixação e Cortes dos Tecidos de Fragmentos da Aorta para Análise por TEM**

A fixação dos tecidos foi feita com base na análise por TEM, tendo sido fixados em glutaraldeído 2,5% e solução de cacodilato de sódio a 0,1M com pH 7,4 de acordo com Viegas *et al.*, 2015. As amostras foram mantidas na solução de fixação durante a noite à temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas duas vezes com o tampão cacodilato e tratadas de acordo com o “protocolo A.1” presente em “Anexos”.

Os tecidos foram tratados e embebidos em resina (mistura de Epon e Araldite). Após solidificação, os blocos de resina que continham as amostras foram alvo de cortes semifinos para visualização em microscópio de luz visível Leica DMLB com câmara Leica DFC290HD e corados com azul de toluidina. Posteriormente os tecidos embebidos na resina foram alvo de cortes ultrafinos para TEM com auxílio do ultramicrotomo. Procedimento levado a cabo pelo técnico responsável Pedro Henriques na Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica.

Os cortes ultrafinos foram colocados numa tina com água e posteriormente depositados sobre grelhas de TEM. Em seguida foram contrastados com acetato de uranilo a 2%, durante cerca de 40 minutos, seguido de 4 minutos em citrato de chumbo, segundo o “protocolo A.3” presente em “Anexos”.

A visualização dos cortes no TEM seguiu os passos descritos no “protocolo A.2”, em “Anexos”.

## **II.2.3. Produção de Grelhas para TEM**

Usaram-se grelhas EMS 200Mesh, no entanto estas mostraram-se sensíveis ao material calcificado. Rompiam a sua membrana. Por isso foram feitas grelhas de TEM segundo o “protocolo A.5” presente em “Anexos”. Utilizaram-se grelhas 300Mesh-Cu que foram cobertas por membrana de *formvar*.

As grelhas com a membrana formada foram depositas sobre papel de filtro dentro de uma caixa de *petri*, para que secassem à temperatura ambiente. Posteriormente estas foram colocadas no evaporador a vácuo para que fosse depositada uma camada de carbono sobre as mesmas de modo a ficarem prontas para adsorção das amostras.

#### II.2.4. Produção de BCPs Sintéticos

A produção e obtenção dos BCPs sintéticos seguiu o procedimento descrito por Viegas *et al.*, 2014. A única diferença cinge-se à concomitante adição da(s) proteína(s) ou do cálcio-fosfato à formação propriamente dita dos BCPs, ou seja, a produção dos BCPs foi feita na presença destes elementos e não como mencionado no artigo referido acima em que primeiro houve uma produção dos BCPs sintéticos com posterior adição da(s) proteína(s) ou do cálcio-fosfato/ fosfato de cálcio.

Foram elaborados BCPs na presença de cálcio-fosfato apenas, na presença de FetA, ou GRP (apenas a stGRP) ou MGP e ainda na presença da mistura destas três últimas ao mesmo tempo. Isto é, segundo as seguintes condições:

- BCP formado na presença de fosfato de cálcio – BCP + CaPO<sub>4</sub>;
- BCP formado na presença da proteína FetA – BCP + FetA;
- BCP formado na presença da proteína GRP – BCP + stGRP;
- BCP formado na presença da proteína MGP – BCP + rGRP;
- BCP formado na presença da mistura de três proteínas, fetA+stGRP+MGP – BCP + Mix Proteínas.

Foi feita uma posterior centrifugação a 20.000xg, durante 20 minutos e à temperatura ambiente tendo sido obtidos os *pellets* de cada amostra. Os *pellets* foram lavados com ácido bórico a 25mM a pH 7,4. Procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições.

#### II.2.5. Tratamento e Análise dos BCPs Sintéticos em TEM

Para a análise por TEM os BCPs descritos e obtidos anteriormente foram fixados em glutaraldeído 3,7% e secos os seus *pellets*. Foram ressuspensos em 10µL de água ultrapura.

A cada grelha foram adsorvidos 3µL da suspensão de BCPs, por 20 minutos. Contrastaram-se as grelhas com acetato de uranilo a 1,5% segundo o “protocolo A.3” em “Anexos”.

A observação dos BCPs por TEM foi conseguida de acordo com o procedimento descrito no “protocolo A.2” em “Anexos” para o microscópio de transmissão em causa.

#### II.2.6. Obtenção dos FMCs dos Soros de Doentes Renais Crónicos e de Pacientes Saudáveis

Os FMCs em causa na presente dissertação foram obtidos e tratados no laboratório da nossa restante equipa envolvida no projeto, sediado na UALG, em Faro, Algarve.

Foram seguidos acordos específicos com o Centro Hospitalar do Algarve, no âmbito das consultas de rotina dos doentes renais crónicos no serviço de nefrologia deste mesmo centro hospitalar.

O estudo foi aprovado pelo *comité* de Ética do Hospital em questão e foram obtidos os consentimentos informados de todos os envolvidos no presente estudo.

Todas as diretivas da Declaração de *Helsinki* foram seguidas.

Os diferentes estadios da doença foram determinados pelos nefrologistas envolvidos neste estudo, tendo em consideração a taxa de filtração glomerular (TGF) de cada paciente envolvido.

Os FMCs foram obtidos do soro de indivíduos doentes diagnosticados com CKD e de indivíduos saudáveis. Seguiram-se os procedimentos descritos na literatura para isolamento de FMCs de diferentes fontes biológicas (Hamano *et al.*, 2010, Price e Lim, 2003).

Após colheita os soros foram centrifugados por 20 minutos, a 3000xg. Foram feitas alíquotas das amostras colhidas e estas congeladas a -80°C até terem sido utilizadas para os ensaios levados a cabo para sua análise morfológica por TEM e para Imunodeteção.

O isolamento dos FMCs foi feito por centrifugação a 16.000xg por 2 horas a 4°C. Seguido por duas lavagens com água.

Na presente dissertação de mestrado foram analisadas amostras de FMCs biológicos descritas e na **Tabela II.3** encontram-se informações detalhadas sobre as mesmas.

**Tabela II.3– Designação e Descrição das Amostras de FMCs Biológicos.**

<b>Amostra FMC Biológico</b>	<b>Descrição</b>
<b>FMC CTR1</b>	FMCs isolados do soro de um paciente saudável, Controlo 1.
<b>FMC CTR2</b>	FMCs isolados do soro de outro paciente saudável, Controlo 2.
<b>FMC CKD5</b>	FMCs isolados do soro de um doente CKD em estadio 5.
<b>FMC CKDhemo</b>	FMCs isolados do soro de um doente CKD em hemodiálise.
<b>FMC CTRpool</b>	<i>Pool</i> de FMCS. FMCs isolados do soro de 3 pacientes saudáveis. Amostra Controlo.
<b>FMC CKDpool5</b>	Pool de FMCs. FMCs isolados do soro de 7 doentes CKD em estadio 5.

## II.2.7. Análise por TEM dos FMCs Biológicos

Os FMCs foram secos à temperatura ambiente para sua posterior análise em TEM. Foram ressuspensos em 10µL de água ultrapura.

A análise mais uma vez seguiu os procedimentos já descritos para os BCPs sintéticos. Tendo sido estes adsorvidos às grelhas de TEM contrastadas posteriormente com acetato de uranilo 1,5% (Protocolo A.3) e analisada a sua morfologia segundo boas práticas de utilização do microscópio, “protocolo A.2”, em “Anexos”.

## II.2.8. Imunodeteção em TEM das Proteínas Modeladoras da Mineralização Ectópica

As imunodeteções das proteínas GRP, FetA e MGP foram feitas em amostras de BCP sintético nas combinações corretas entre anticorpo primário e secundário e nas diluições adequadas. Seguindo a informação da **Tabela II.4** no presente capítulo.

A amostra de BCP utilizada foi sintetizada na presença das três proteínas (BCP + Mix Proteínas).

Foi seguido um protocolo baseado em Thery *et al.*, 2006, que se encontra em “Anexos – Protocolo A.4”.

Na presente dissertação procedeu-se à otimização desse protocolo tendo sido alvo de alterações significativas no que diz respeito a tempos de incubação, agentes de permeabilização e à conjugação de nanopartículas de ouro com os anticorpos secundários utilizados.

Foram usadas gotas de 4µL de anticorpos a incubar, por períodos de 1h. E como agente de permeabilização usou-se o Triton X-100.

Após a adsorção das amostras às grelhas seguiram-se os tempos de lavagem e bloqueio com posterior incubação primária e secundária, ao longo do tempo. As amostras adsorvidas às grelhas sofreram uma breve fixação final com glutaraldeído 1% e foram alvo de contraste por parte do acetato de urânio 1,5%.

As grelhas foram analisadas no microscópio de TEM mencionado em Equipamentos, na Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica.

Os controlos negativos utilizados para cada imunodeteção tiveram ausente o anticorpo primário. Tendo este sido substituído pela mesma quantidade em PBS na sua incubação. O anticorpo secundário respetivo foi adicionado (**Tabela II.4**).

**Tabela II.4 - Imunodeteções Realizadas e Combinações de Anticorpos Utilizados.**

	Anticorpos utilizados				
	Rabbit anti-tGRP 1:20	Rabbit anti-FetA 1:40	Mouse anti-tMGP 1:20	Anti-rabbit igG Au-10nm 1:15	Anti-mouse igG Au-5nm 1:20
<b>Imunodeteção da GRP</b>	X			X	
<b>Imunodeteção da FetA</b>		X		X	
<b>Imunodeteção da MGP</b>			X		X
<b>Controlo Negativo a anti-rab igG Au-10nm</b>				X	
<b>Controlo Negativo a anti-rab igG Au-5nm</b>					X

## II.2.9. Colocalização de GRP e Fetuina-A Humana em TEM

Esta técnica assentou nos mesmos precedentes que a imunodeteção, uma vez que consiste em duas imunodeteções sequenciais.

A colocalização permitiu a identificação de duas proteínas ao mesmo tempo pelo uso de diferentes anticorpos secundários, mencionados na **Tabela II.2** aos quais foram conjugadas nanopartículas de ouro de diferentes diâmetros. Foram distinguidas devido ao seu tamanho, de 5 e 10nm.

A colocalização foi levada a cabo segundo o “protocolo A.4” presente nos “Anexos”. Tendo sido repetido o mesmo por duas vezes, consecutivas. Diferindo na parte de adsorção das amostras às grelhas, que só foi feita uma vez.

Na primeira imunodeteção o passo que consistiu na fixação parcial através da utilização de glutaraldeído 1% foi suprimido. Só tendo sido posto em prática na segunda repetição do protocolo, para a segunda imunodeteção parcial.

Em suma, na primeira imunodeteção houve adsorção à grelha, bloqueio, lavagens e incubação do primeiro anticorpo de interesse com consequente incubação do anticorpo secundário respetivo. Sem o passo de fixação. Na segunda imunodeteção repetiu-se o passo de bloqueio por glicina e BSA em PBS. Prosseguiu-se em diante com o protocolo por forma a realizar-se nova incubação com o segundo anticorpo primário de interesse e respetiva incubação do anticorpo secundário. Finalmente fixou-se com glutaraldeído 1% e o protocolo foi seguido até ao fim. As grelhas passaram por um processo de contraste negativo com acetato de uranilo a 1,5%.

A colocalização foi realizada nas amostras FMC CTRpool e FMC CKDpool5. Na **Tabela II.5** encontram-se descritas as combinações de anticorpos utilizadas e os controlos negativos à mesma, em cada amostra.

**Tabela II.5 – Colocalização de GRP e Fetuina-A Humana, Respetivas Combinações de Anticorpos e Controlos à Experiência.**

	Anticorpos Utilizados			
	Rabbit anti-tGRP	Mouse anti-FetH	Anti-rabbit igG Au-10nm	Anti-mouse igG Au- 5nm
<b>FMC CTRpool</b>	X	X	X	X
<b>FMC CTRpool - fetH (Controlo)</b>	X		X	X
<b>FMC CTRpool – GRP (Controlo)</b>		X	X	X
<b>FMC CKDpool5</b>	X	X	X	X
<b>FMC CKDpool5 – fetH (Controlo)</b>	X		X	X
<b>FMC CKDpool5 – GRP (Controlo)</b>		X	X	X

#### **II.2.10. Preparação das amostras FMC e BCP para SEM e Microanálise**

Os FMCs biológicos vistos por SEM foram as amostras FMC CTR2 e FMC CKD5 e foi ainda alvo de análise uma amostra BCP de sintético produzido na presença da Mix de Proteínas.

As amostras encontravam-se já adsorvidos a grelhas TEM. As suas grelhas foram apenas coladas com fita de dupla face ao suporte do microscópio usado. Não houve qualquer preparação especial da amostra para ser vista em SEM. As amostras foram varridas a – 80Kv e foram utilizadas ampliações de 40000x.

Quanto à microanálise (SEM-EDS) foram adquiridas imagens pontuais de alguns complexos de material visíveis e foram feitos mapeamentos de elementos, nomeadamente do cálcio e do fósforo.

Esta análise SEM-EDS ficou ao encargo do serviço prestado na FCT- UNL, pelo CENIMAT, Monte de Caparica.

#### **II.2.11. Análise FTIR de FMC Biológico**

As amostras de mineral utilizada correspondeu a uma *pool* de FMCs obtidos dos soros de doentes CKD em diálise pelas colaboradoras da UALG, Faro.

Utilizou-se a amostra liofilizada e portanto em estado sólido sem preparação prévia.

A amostra foi pressionada entre as duas células de diamante do aparelho de microFTIR até se tornar em uma película fina. Como branco para a presente análise foi feito um espectro FTIR numa zona sem amostra prensada.

Desta experiência FTIR obtiveram-se dois espectros referentes a duas regiões distintas da amostra de FMC CKD.

Esta experiência foi feita em colaboração com o Departamento de Conservação e Restauro da FCT-UNL, Monte de Caparica.

#### **II.2.12. Análise por ICP-AES de FMC Biológico**

A amostra utilizada na técnica de ICP-AES foram FMCs de doentes com CKD, nomeadamente de *pools* em que se juntaram no mesmo tubo vários pacientes na mesma condição.

Cada amostra foi submetida a um tratamento com ácido nítrico. Foram adicionadas cerca de 10 gotas a cada amostra e posteriormente adicionada a mesma quantidade de água ultrapura, lentamente.

O restante material não dissolvido por este processo sofreu uma breve sonicação de 90 minutos até à sua total dissolução.

Os diferentes FMCs foram levados para análise ao laboratório de Análises do DQ e já devidamente tratadas e preparadas. O branco utilizado foi água ultrapura.

#### **II.2.13. Tratamento de imagens de TEM**

Todas as imagens TEM adquiridas no âmbito desta dissertação foram tratadas segundo algumas diretrizes específicas e no programa *ImageJ*, onde se convertem as imagens em 16 bits e em preto e branco. As imagens são normalizadas segundo a subtração do branco à imagem a tratar, ou



seja, é subtraída à imagem ampliada uma imagem da tela branca do visor do TEM utilizado. As imagens são gravadas em formato TIFF, para obtenção de uma melhor qualidade.

Após um primeiro tratamento neste programa, as imagens são ajustadas no que diz respeito a níveis de luminosidade, contraste e escala de cinzas no programa *GIMP*, sendo posteriormente gravadas novamente em formato TIFF e JPEG, este último menos pesado e de qualidade inferior.

Ambos os programas são gratuitos e estão disponíveis na internet. *ImageJ* disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. GIMP disponível em <https://www.gimp.org/downloads/>.



### III. Resultados

#### III.1. Caracterização Morfológica por TEM dos Tecidos de Fragmentos da Aorta Submetidos a Condições Mineralizantes e na Presença das Proteínas stGRP e rGRP. Presença de MVs com Material Calcificado e Elastina Degradada

Na presente experiência foram analisados morfológicamente por TEM diferentes cortes histológicos de fragmentos da aorta. Estes fragmentos foram colocados em cultura durante 13 dias, em distintas condições. Foram colocados em meio normal, funcionando como controlo à experiência (CTR); em meio mineralizante (MM), capaz de induzir a mineralização da matriz; em meio mineralizante suplementado com a proteína GRP de esturjão (stGRP) e em meio mineralizante suplementado com proteína GRP recombinante (rGRP).

Os tecidos, em cada condição distinta, foram alvo de três recolhas no tempo, após cultura. Ao tempo 1 corresponde a primeira recolha dos tecidos para análise após 4 dias em cultura, ao tempo 2 corresponde a segunda recolha após mais 4 dias em cultura e ao tempo 3 corresponde a última recolha, num total de 13 dias em meio de cultura.

Os fragmentos de aorta como mencionado em “Materiais e Métodos” foram colhidos durante cirurgias em pacientes controlo (não doentes com CKD).

Pretendeu-se com esta experiência analisar por TEM diferenças morfológicas da ECM, deposição de vesículas da matriz e verificar as alterações estruturais presentes com o tratamento indutor de calcificação. E ainda correlacionar no espaço e no tempo estes eventos, ou seja, pretendeu-se averiguar se ao longo do tempo seriam encontradas diferenças significativas na morfologia do material que indicasse uma evolução da sua calcificação.

Os tecidos provenientes dos cortes histológicos de fragmentos da aorta cultivados durante 13 dias em condições de cultura controlo e em meio mineralizante (níveis de fosfato de cálcio elevados) conforme descrito em Viegas *et al.*, 2015, foram analisados por TEM e as imagens representativas encontram-se na **Figura III.4**.

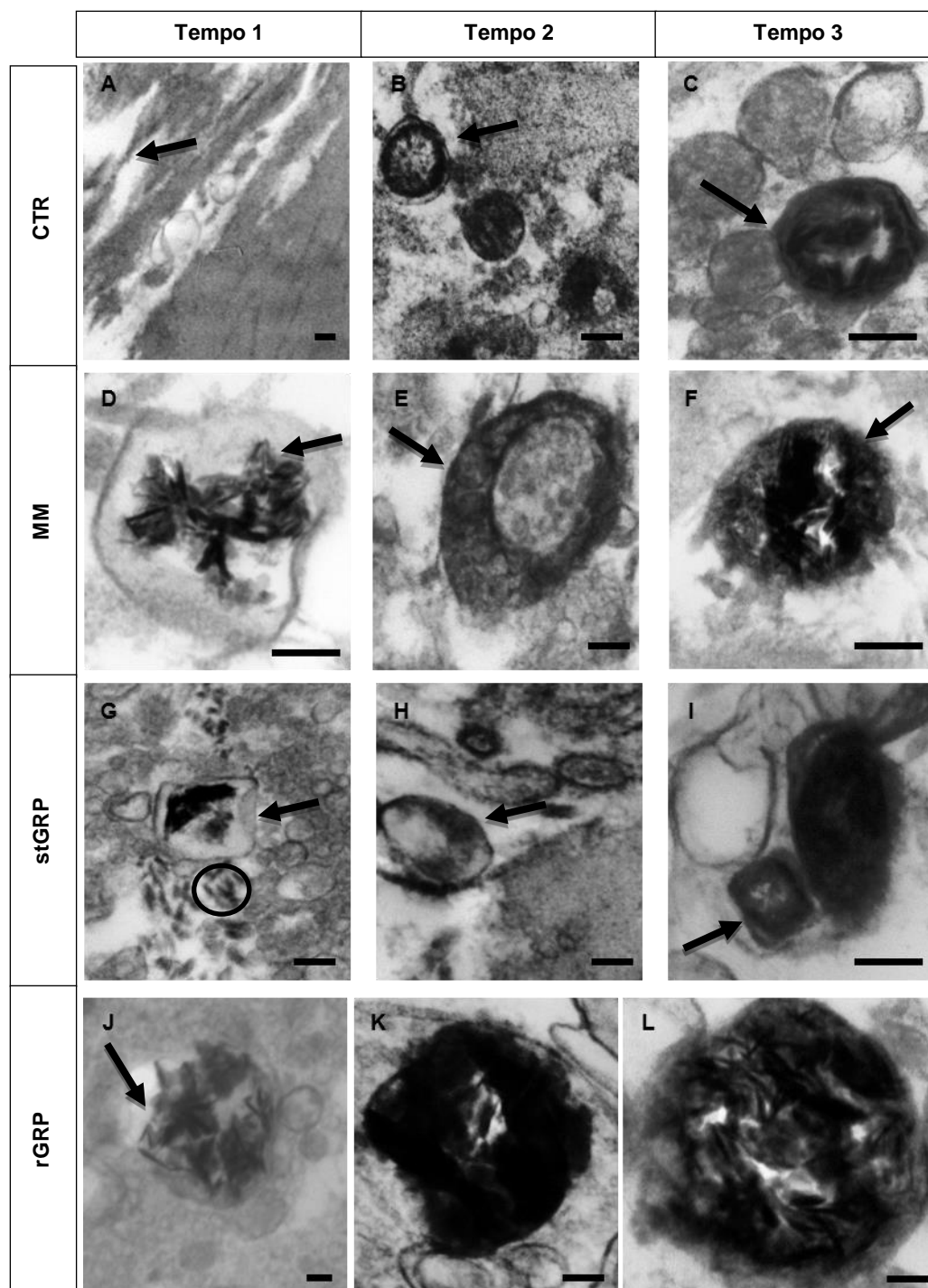
No que diz respeito aos fragmentos de aorta, cultivados em condições controlo (CTR) e recolhidos após 4 dias em cultura (tempo 1), na imagem (A) não apresentam nenhuma MV. No entanto é visível a existência de elastina fragmentada, assinalada pela seta.

Segundo os resultados obtidos nas imagens (B) e (C) conseguimos verificar que nos tecidos em condições controlo (CTR), nos tempos 2 e 3, recolha após 8 dias e 13 dias em cultura respetivamente, existem MVs que variam em tamanho e número e que aparentam conter mineral, ainda que este seja de aspeto mais amorfo que o característico da deposição de HA.

Quanto à condição mineralizante (MM) relativamente aos tempos 1 e 3, nas imagens (D) e (F) são visíveis cristais em formato de agulha. Em (F) os cristais encontram-se dentro da MV representada. No entanto, na imagem (E), condição CTR no tempo 2 – recolha 8 dias após cultura - a MV não apresenta cristais definidos, apenas algum material calcificado mas mais amorfo.

Nas condições de mineralização, MM, meio mineralizante suplementado com stGRP e meio mineralizante suplementado com rGRP, mais propriamente nas imagens (D), (F), (J), (K) e (L) são bastante notórios os cristais bem definidos característicos da presença de HA. No entanto as imagens (E) meio mineralizante e (H) meio mineralizante com stGRP respeitantes ao tempo 2 contrariam o comportamento anteriormente descrito por conterem MVs mais densas mas sem material tão bem definido em formato de agulha como as restantes.

Por fim, na imagem (G) é de salientar a existência de micro agulhas fora de MVs, na ECM. E na imagem (I) está representada uma estrutura cristalina de maiores dimensões e sem aparência de agulhas finas e definidas.



**Figura III.4 - Morfologia dos Tecidos de Fragmentos da Aorta em Condições Mineralizantes e na Presença de stGRP e rGRP.** Imagens correspondentes a três tempos distintos de recolha após cultura em diferentes condições. O **tempo 1** corresponde à primeira recolha após 4 dias em cultura, o **tempo 2** corresponde à segunda recolha após 8 dias em cultura e o **tempo 3** corresponde à última recolha, após mais 4 dias em cultura, num total de 13 dias. (A), (B) e (C) condição controlo CTR. (D), (E) e (F) condição mineralizante MM. (G), (H) e (I) condição mineralizante com stGRP. (J), (K) e (L) condição mineralizante com rGRP. Na figura (A) a seta indica elastina fragmentada. Nas restantes imagens as setas servem para realçar exemplos de vesículas da matriz (MVs) com aspeto calcificado de material amorfo (B), (C), (E) e (H). E nas imagens (D), (F) e (J) as setas indicam material agulhar em MVs. Nas imagens (G) e (I) indicam algum tipo de material geométrico calcificado. O círculo na imagem (G) indica a existência de material calcificado em forma de agulhas fora de MVs. (K) e (L) representam Mvs com material calcificado bem definido. Barra de escala: 200nm.

### **III.2. Caracterização Morfológica por TEM de BCPs Sintéticos na Presença de Proteínas Modeladoras da VC – FetA, stGRP, rGRP – ou na Presença de Mistura de Proteínas – FetA, MGP e stGRP. Mudanças Morfológicas Identificáveis na Presença Individual das Proteínas Estudadas e na Presença da Mistura Proteica**

De modo a avaliar a capacidade da GRP e fetA em se ligarem de forma direta ao mineral de CaP e influenciarem a sua formação e maturação procedemos à análise por TEM da morfologia característica de amostras de BCPs sintéticos preparadas de acordo com procedimentos já descritos (Viegas et al., 2014). Em que temos distintas condições de síntese, BCPs sintetizados na ausência de proteínas (BCPs controlo – BCP + CaPO<sub>4</sub>); BCPs sintetizados na presença de fetuina-A (BCP + fetA); BCPs sintetizados na presença de GRP de esturjão (BCP + stGRP); BCPs sintetizados na presença de GRP recombinante (BCP + rGRP) e BCPs sintetizados na presença de fetuina-A, MGP e stGRP concomitantemente (BCP + Mix de proteínas).

Estas análises por TEM da morfologia dos BCPs sintéticos serviram para nos indicar se as estruturas dos BCPs controlo diferem ou não das estruturas encontradas nas amostras preparadas de BCPs sintéticos na presença de várias proteínas individualmente, Fetuina A, stGRP, rGRP e na mistura das proteínas fetA-MGP-stGRP. E ainda para avaliar a importância dos resíduos Gla na formação dos BCPs por comparação das experiências efetuadas na presença de rGRP ou stGRP.

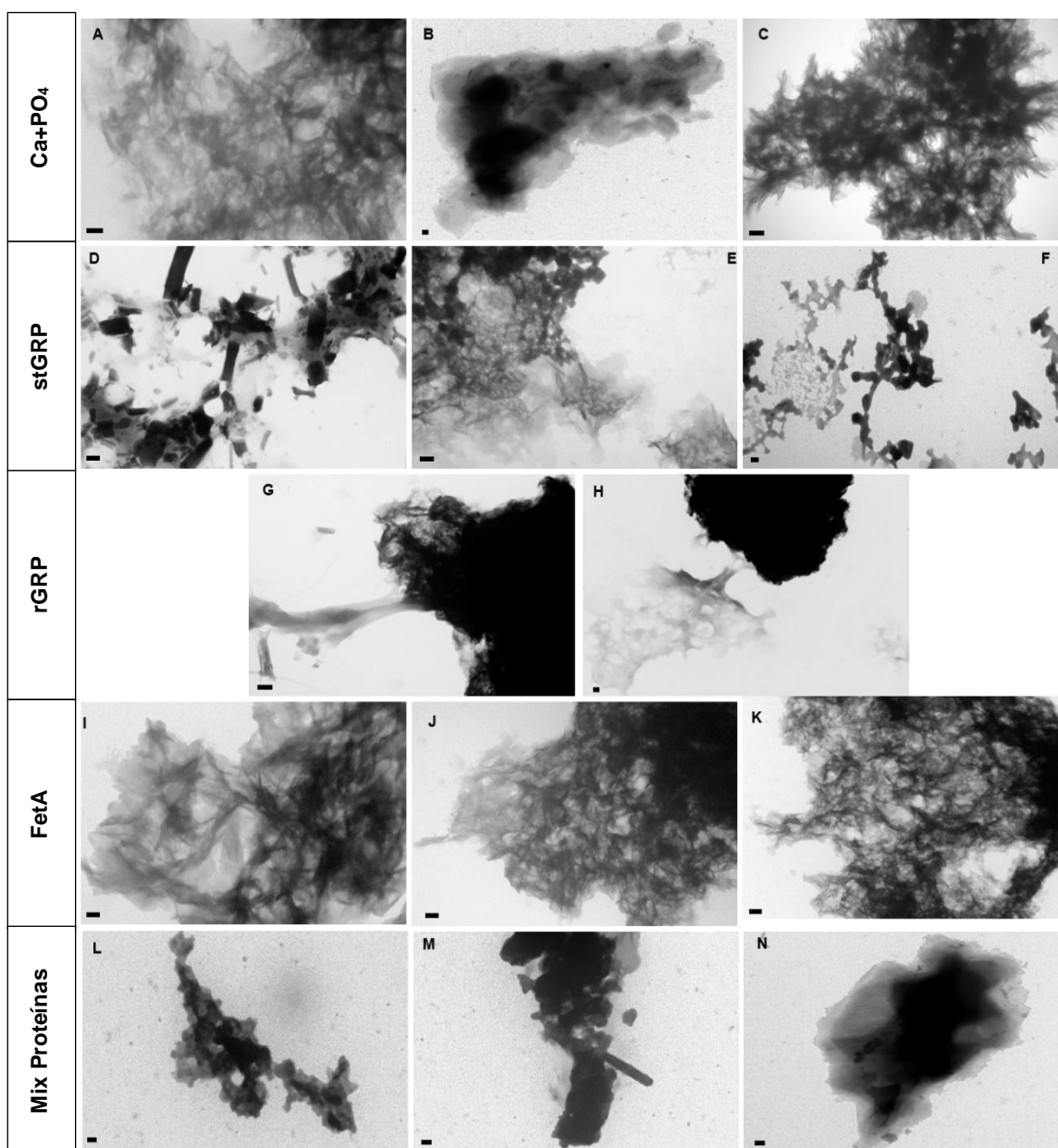
Na **Figura III.5** encontra-se a compilação de imagens representativas das amostras de BCPs sintéticos analisadas, na presença de fetA ou de rGRP ou de stGRP ou de Mix de proteínas, em que parece existir uma diferença na evolução do processo de formação do mineral, dependente da presença ou ausência das proteínas. Nas imagens (A), (B) e (C) estão representadas estruturas características de HA. No entanto (B) apresenta-se um pouco diferente. Está representado um aglomerado de material com padrão de difração característico ao do cristal (resultado não apresentado).

Na experiência de formação do BCP na presença de stGRP, observável nas imagens (D), (E) e (F) é visível a existência de material bem definido, com forma cristalina evidente em (D). Em (E) é notória a existência de algumas folhas de cristais HA e em simultâneo identifica-se material de aspeto mais globular, canto superior esquerdo da imagem. Por fim, em (F) esses aglomerados de material globular são mais evidentes que em (E).

Nos BCPs formados na presença de rGRP, correspondendo aos painéis (G) e (H), encontramos material mais denso e um outro tipo de material menos denso. Contudo não existem mudanças morfológicas tão acentuadas como na presença das outras proteínas. De uma forma geral o aspeto é mais amorfo e denso que o encontrado nos BCPs controlo.

Nas imagens (I), (J) e (K), que correspondem à condição de BCPs preparados na presença de fetA, não se observa uma grande diferença relativamente às imagens (A) e (C). Continuam a ser representativas de material com a mesma morfologia de HA.

Por último, na incubação com as três proteínas em simultâneo, fetA-MGP-stGRP (BCP + mix proteínas) a rede de HA não é evidente. Em (L) temos representada uma estrutura central de aspeto globular. Em (M) voltamos a ter cristais de aparência bem definida e em (N) a mesma situação que em (B), a de material amorfo mas com padrão de difração característico de cristal (não apresentado).



**Figura III.5 - Morfologia dos BCPs Sintéticos por TEM na Presença de Proteínas Modeladoras da Mineralização.** Produção dos BCPs em condições distintas, BCP na ausência de proteína, BCP na presença de fetA ou stGRP ou rGRP ou de uma mistura proteica MGP-stGRP-fetA. (A), (B) e (C) BCP sintético + CaPO<sub>4</sub>, considerado controle. (A) e (C) mostram uma rede de material fibrilar, (B) um conjunto de material amorfo que apresentou um padrão de difração para cristal. (D), (E) e (F) BCP sintético + stGRP. (D) apresenta material calcificado, cristalitos. (E) cristais em folha, característica de HA e material arredondado e menos definido. (F) aglomerados de material com forma arredondada. (G) e (H) BCP sintético + rGRP. Apresentam material mais denso que parece interagir com material menos denso. (I), (J) e (K) BCP sintético + FetA. Apresentam estruturas similares entre si e características de material calcificado (cristais) e de material amorfo. (L), (M) e (N) BCP sintético + Mix Proteínas, nomeadamente, stGRP, MGP e fetA. (L) apresenta aglomerado de material globular. (M) estruturas de aparência geométrica no aglomerado de material calcificado. (N) idêntica a (A), com estrutura cristalina menos definida. Apresentou padrão de difração não apresentado. Barra de escala: 200nm.

### **III.3. Caracterização Morfológica por TEM de Amostras de FMCs Biológicos Isolados do Soro de Indivíduos Saudáveis e de Doentes com CKD. Estruturas Morfollogicamente Distintas entre Amostras de Indivíduos Saudáveis e Amostras de Doentes com CKD**

Para a caracterização morfológica por TEM de FMCs Biológico procedeu-se ao isolamento destas nanopartículas circulantes dos soros de doentes com CKD e de pacientes saudáveis.

Na presente experiência foram alvo de análise morfológica diferentes amostras de FCMs. Analisaram-se pacientes saudáveis tendo sido atribuído às suas amostras de FMCs os nomes de FMC CTR, que significam que são amostras Controlo de FMCs derivados do soro de pacientes saudáveis. Por sua vez as amostras de FMCs derivados de doentes CKD designaram-se por FMC CKD sendo colocado à frente da designação o número correspondente ao estadio da doença em que o doente ou doentes se encontravam. Quando as amostras se referem a uma *pool* de doentes do mesmo estadio de onde foram isolados os FMCs biológicos têm a designação de amostra FMC CKDpool.

Com a experiência de análise TEM de FMCs biológicos pretendeu-se concluir algo sobre a evolução da calcificação consoante o estadio mais ou menos avançado de CKD, através da cateterização morfológica por TEM das estruturas encontradas.

Na **Figura III.6** estão compiladas imagens representativas de algumas das amostras FMC analisadas por TEM. Sendo que foram usados os indivíduos controlo (saudáveis) designados por FMC CTR1 (A-B) e FMC CTR2 (C); indivíduo portador de CKD, designados por FMC CKD5 que se encontrava em estadio 5 de CKD (D); uma *pool* de doentes em estadio 5 designada por FMC CKDpool5 (E) e (F); um doente em hemodiálise designado por FMC CKDhemo (G).

As imagens que dizem respeito a FMCs isolados a partir do soro de indivíduos saudáveis, amostras FMC CTR 1 e 2 (A-C) apresentam material mais amorfo, de aspeto pouco definido e com possível matriz proteica associada, algo dispersa. Em que (A) verificamos um rearranjo de fosfolípidos. Em (B) temos um aglomerado de material de aspeto idêntico a (C) mas em menor quantidade.

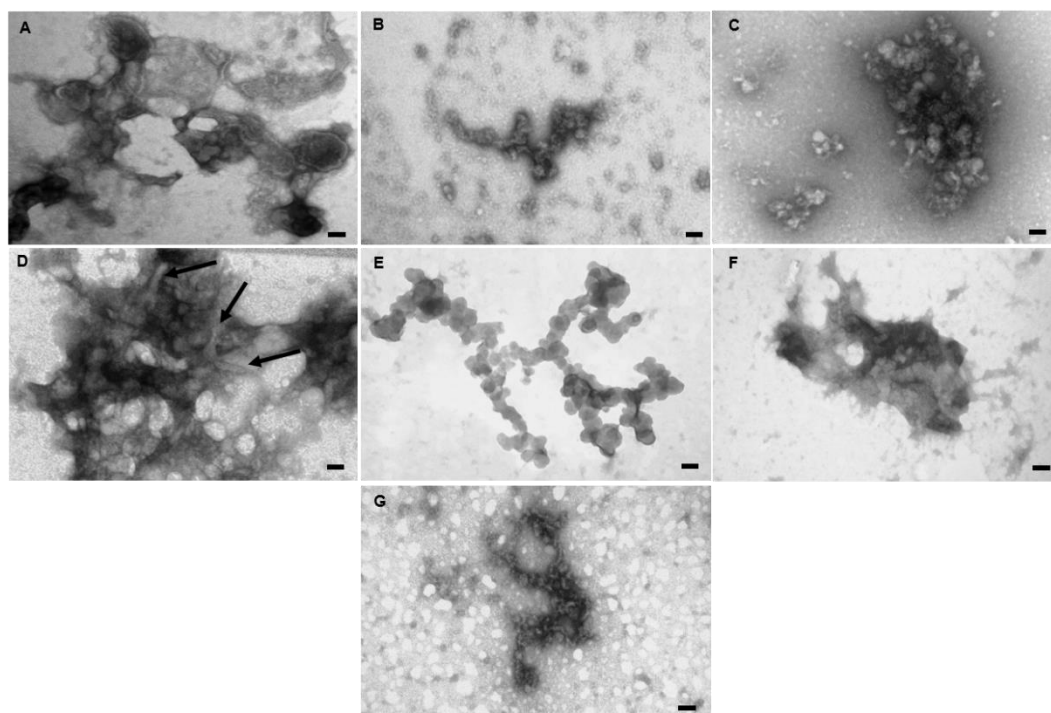
Quanto às imagens que representam amostras de FMCs derivados de doentes CKD5 (D-F) em (D) temos uma amostra de FMC CKD5 representada por uma teia de material amorfo mas que possui cristais visíveis, indicados pelas setas. Em (E) FMC CKDpool5 apresenta uma estrutura muito distinta da outra imagem representativa da mesma *pool* (F). EM (E) vemos um aglomerado globular que não foi visto em mais nenhuma outra condição e em (F) voltamos à situação encontrada em (D) de um material mais amorfo, com possível calcificação mas onde não se encontram agulhas visíveis.

Para finalizar em (G) a análise TEM de FMCs isolados do soro de um doente CKD em hemodiálise, (FMC CKDhemo) apresenta material pouco definido e associado a algum tipo de matriz proteica.

Verifica-se uma grande heterogeneidade de estruturas morfológicas encontradas entre FMCs controlo e FMCs derivados de doentes CKD e até mesmo na mesma amostra, nomeadamente na



amostra FMC CKDpool5 (E-F) verificamos a presença de dois tipos de estruturas de morfologias distintas.



**Figura III.6 - Morfologia por TEM de FMCs Biológicos Isolados do Soro de Pacientes Saudáveis e de Doentes com CKD em estadio 5 (CKD5).** (A), (B) e (C) são amostras de FMCs derivados de doentes saudáveis e portanto funcionam como controlos, amostras FMC CTR. (A) amostra FMC CTR1 com presença de rearranjo de fosfolípidos e material amorfo. (B) amostra FMC CTR1 com aglomerado de material mais arredondado. (C) amostra FMC CTR2 apresenta grande aglomerado de material globular e amorfo. (D), (E) e (F) são amostras de FCMs derivados de doentes em estadio 5. (D) representa FMCs isolados do soro de um doente em estadio 5 de CKD (FMC CKD5) e apresenta agulhas de HA indicadas pelas setas. (E) corresponde a FMCs derivados de uma pool de doentes CKD todos no mesmo estadio, nomeadamente em estadio 5 cujo nome da amostra é FMC CKDpool5. Apresenta material de aspeto globular formando uma espécie de “cacho”. Em (F) a amostra FMC CKDpool5 apresenta uma estrutura com aspeto similar a (D), mas com menor quantidade de material e sem agulhas visíveis. (G) representa uma imagem da amostra de FMCs do doente em hemodiálise (FMC CKDhemo) com material pouco definido e com algum tipo de matriz proteica presente. Barra de escala: 200nm.

### III.4. Comparação Morfológica por TEM de Amostras de FMCs Biológicos Derivados de Indivíduos Saudáveis e de Doentes com CKD com Amostras de BCPs Sintéticos.

#### Estruturas Morfológicas Semelhantes Encontradas entre FMCs Biológicos e BCPs Sintéticos

Os FMCs Biológicos obtidos de soro de doentes CKD e de indivíduos saudáveis (FMCs controlo) permitem obter bastante informação de carácter fisiopatológico sobre o papel destas nanopartículas *in vivo*, uma vez que são constituídos por múltiplos agentes, nomeadamente HA e proteínas modeladoras do processo de mineralização, tais como fetA, GRP e MGP. Os BCPs por serem de origem sintética apenas interagem com as proteínas com as quais foram incubados. Portanto são um bom modelo para estudos morfológicos por TEM de estruturas calcificadas em que se quer fazer o paralelismo entre o que acontece *in vitro* com o que sucede *in vivo*, uma vez que não se encontram num contexto fisiológico e que não possuem associados a si outros intervenientes proteicos como no caso dos FMCs de origem biológica (Pasch et al., 2012).

As amostras comparadas dizem respeito a FMCs derivados do soro de doentes CKD, a FMCs derivados do soro de indivíduos saudáveis relativamente a amostras de BCP sintético produzido na presença/ausência da(s) proteína(s) modeladora(s) da mineralização ectópica. Nomeadamente, comparou-se a amostra de FMCs derivados de um doente em estadio 5 de CKD, FMC CKD5 com a amostra *pellet* de BCP sintético controlo, produzido na ausência de proteínas, BCP+CaPO<sub>4</sub>. Comparou-se a amostra de FMCs isolados do soro de uma *pool* de doentes no mesmo estadio de CKD, no estadio 5 (amostra CKDpool5) com o *pellet* obtido da amostra BCP sintético produzido na presença de stGRP – BCP+stGRP. E por fim, comparou-se uma amostra de FMCs isolados de soro de um indivíduo controlo, saudável (amostra FMC CTR2 já mencionada em “Resultados”) com o *pellet* obtido do BCP sintético produzido na presença de MGP, stGRP e fetA – BCP+Mix Proteínas.

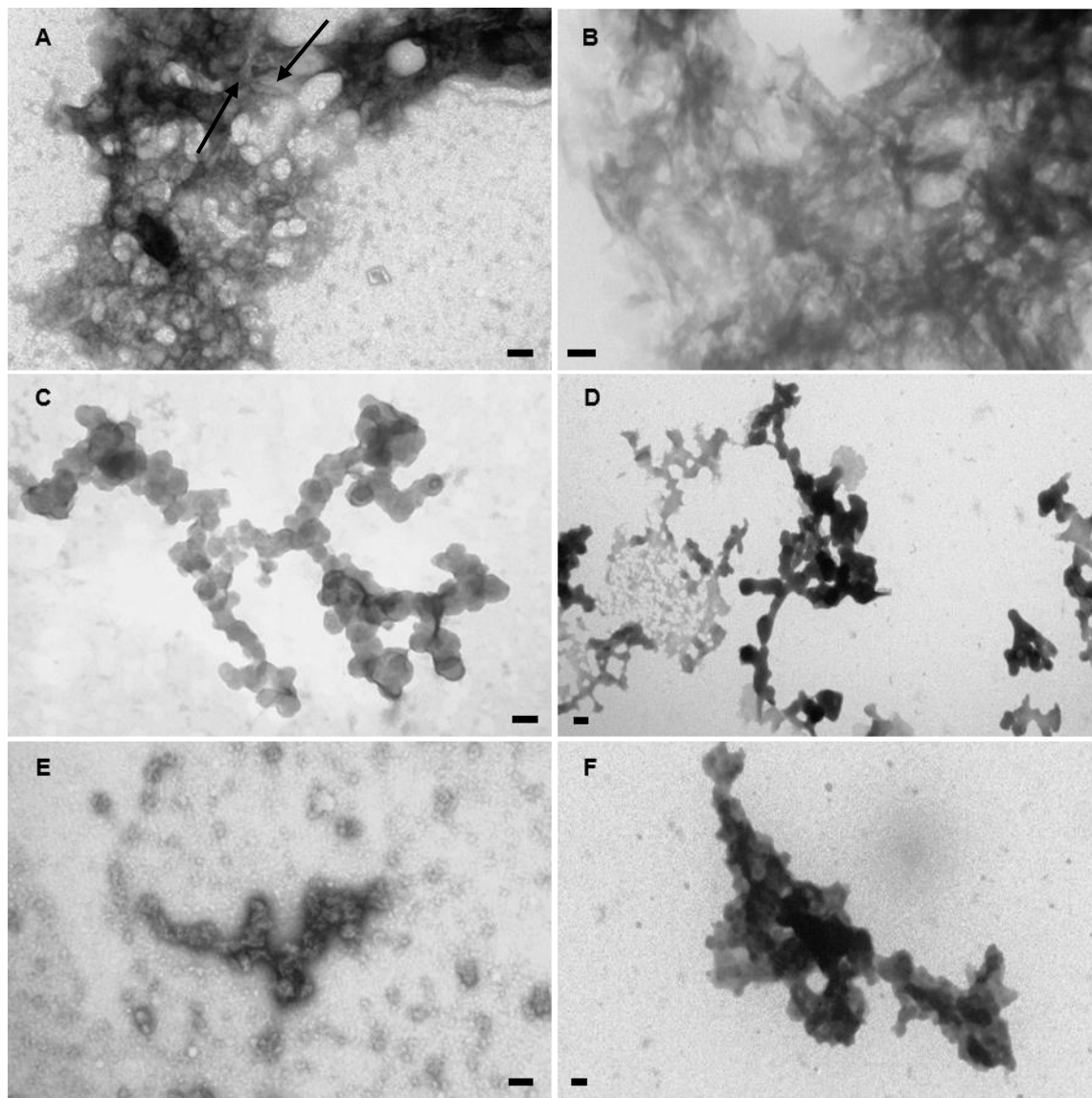
Pretendeu-se portanto comparar as estruturas encontradas nos FMCs biológicos com as estruturas características e encontradas nos *pellets* dos BCPs sintéticos por forma a detetar diferenças e semelhanças morfológicas entre elas.

Os BCPs sintéticos em alguns casos mostraram-se morfológicamente idênticos aos FMCs biológicos quando analisados por TEM. Na **Figura III.7**, a imagem (A) representa a amostra de FMCs derivados de um doente em estadio 5, FMC CKD5, que é morfológicamente comparável com (B) onde está representada uma amostra *pellet* de BCP sintético na ausência de proteínas, uma vez que em ambas as imagens se veem teias de material com possível existência de matriz proteica e material calcificado. A imagem (B) é bastante sugestiva da presença de HA na amostra.

Em (C) temos a amostra FMC CKDpool5 que diz respeito a FMCs derivados de uma *pool* de doentes em estadio 5 de CKD. A imagem (D) representa a amostra *pellet* BCP sintético + stGRP. Ambas apresentam um aglomerado de material globular, sendo expectável algum tipo de interação entre material calcificado e proteínas presentes.

Na imagem (E) temos a amostra de FMCs isolados de um indivíduo saudável designada por FMC CTR2 e em (F) temos o *pellet* referente a um BCP sintético + Mix Proteínas. Ambas apresentam material em formato de cacho e são bastante distintas das imagens (A) e (B) mas um pouco similares

ao aspeto globular de (C) e (D). No entanto (E) e (F) apresentam glóbulos menos definidos e menos individualizados.



**Figura III.7 - Comparação Morfológica por TEM de FMCs Biológicos Derivados de Doentes com CKD e de Indivíduos Saudáveis com BCPs sintéticos.** (A) representa a amostra de FMCs derivados do soro de doente em estadio 5 de CKD, FMC CKD5, com teia de material amorfo e parcialmente calcificado. Agulhas indicadas pelas setas. (B) representa amostra *pellet* de BCP sintético produzido na ausência de proteínas, BCP sintético +  $\text{CaPO}_4$ , com morfologia similar a (A) mas sem agulhas visivelmente definidas. (C) representa a amostra de FMCs isolados do soro de uma *pool* de doentes em estadio 5 de CKD, FMC CKDpool5, com material de aspeto globular em cacho. (D) diz respeito à amostra de BCP sintético produzido na presença da proteína GRP de esturção, BCP+stGRP, e apresenta o mesmo tipo de estruturas morfológicas que (C). (E) representa a amostra de FMCs derivados do soro de um indivíduo controlo, FMC CTR2, e (F) representa o *pellet* de BCP sintético produzido na presença de stGRP, fetA e MGP, BCP + Mix Proteínas. Ambas as amostras também apresentam material globular mas mais concentrado e menos definido que em (C) e (D). Barra de escala: 200nm.

### **III.5. Imunodeteção em TEM das Proteínas Modeladoras do Processo de Mineralização Vascular – GRP, fetA e MGP - em BCPs Sintéticos. Antígenos Detetados com Especificidade por Anticorpos Conjugados com Nanopartículas de Ouro de Diâmetros Diferentes**

Para deteção, em amostras *pellet* de BCPs sintéticos, da presença de determinadas proteínas modeladoras do processo de mineralização vascular, nomeadamente GRP, FetA e MGP, recorreu-se à otimização de um protocolo de imunodeteção em TEM, “Protocolo A.4,” baseado em Thery *et al.*, 2006.

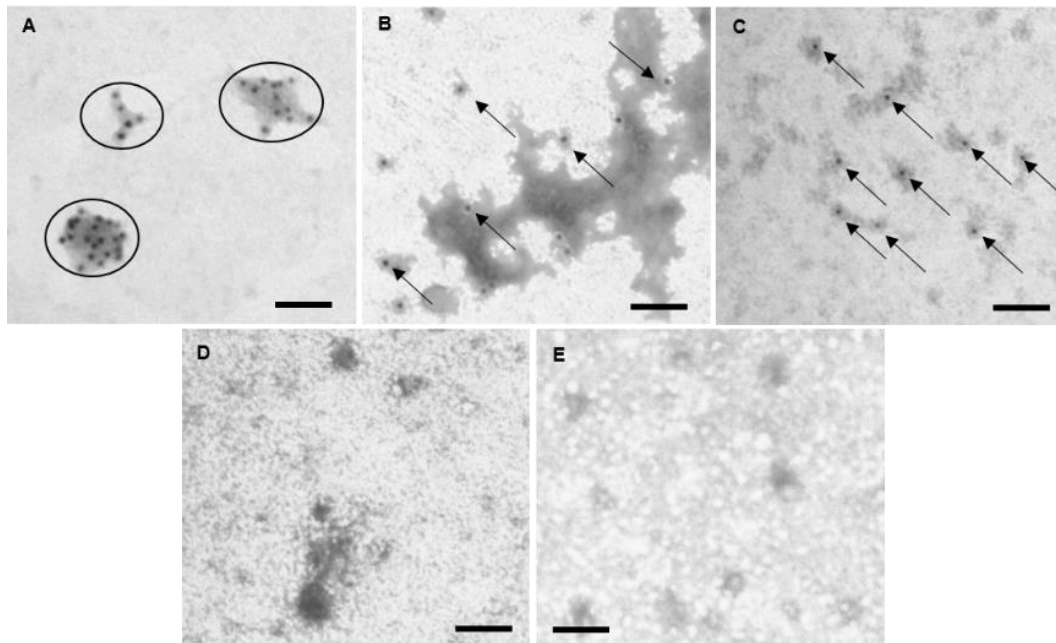
A **Figura III.8** inclui uma compilação de imagens representativas das imunodeteções destas proteínas em amostras de *pellet* de BCP sintético produzido na presença das três proteínas, stGRP-MGP-fetA, BCP + Mix Proteínas.

A imagem (A) refere-se à imunodeteção de GRP em que se utilizou o anticorpo primário rabbit anti-tGRP (Cterm) e o seu anticorpo secundário respetivo. Em (A) podemos observar que a imunodeteção funcionou porque são visíveis pequenos aglomerados de material marcados com múltiplas nanopartículas de ouro de 10nm de diâmetro.

Em (B) temos representada a imunodeteção da proteína fetA. Foi utilizado o anticorpo primário rabbit anti-fetA e o seu anticorpo secundário respetivo. E verificamos a presença de marcação. A imunodeteção de FetA parece apresentar menos marcação visível relativamente à imunodeteção de GRP.

A imagem (C) corresponde à imunodeteção de MGP com utilização do anticorpo primário mouse anti-tMGP. A marcação apresenta-se dispersa como em (B) mas são visíveis mais nanopartículas de ouro.

Por fim, (D) e (E) são controlos negativos da experiência. Sendo (D) o controlo para o anticorpo secundário anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm e (E) o controlo negativo ao anticorpo secundário anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm. Nenhum dos controlos apresenta marcação visível. Os anticorpos parecem apresentar especificidade para os respetivos antígenos. Em (D) existe mais material que na imagem (E).



**Figura III.8 - Imunodeteções em TEM de Proteínas Modeladoras do Processo de Mineralização Vascular (GRP, FetA e MGP) em BCPs Sintéticos.** Amostra de BCP sintético produzido na presença das três proteínas GRP-FetA-MGP, BCP+ Mix Proteínas. (A) Imunodeteção de GRP com o anticorpo rabbit anti-tGRP (Cterm) e anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm. Apresenta marcação visível. (B) Imunodeteção de fetA com anticorpo rabbit anti-fetA e anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm. Apresenta marcação mas mais dispersa que em (A). (C) Imunodeteção de MGP com o anticorpo primário mouse anti-tMGP e anticorpo secundário anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm. Apresenta marcação dispersa como em (B) mas menos material presente. (D) e (E) são controles negativos. (D) controle negativo ao anticorpo secundário anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm e (E) controle negativo ao anticorpo secundário anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm. Sem marcação visível. Não apresentam nanopartículas de ouro. Setas indicam alguns exemplos de marcação dispersa. Círculos realçam marcação sob pequenos aglomerados de material. Barra de escala: 200nm.

### **III.6. Colocalização em TEM de Proteínas Modeladoras da Mineralização Vascular – Fetuina-A Humana e GRP- em FMCs Biológicos. Marcação Distinta dos Dois Antígenos a Detetar através de Anticorpos Secundários Conjugados com Nanopartículas de Ouro**

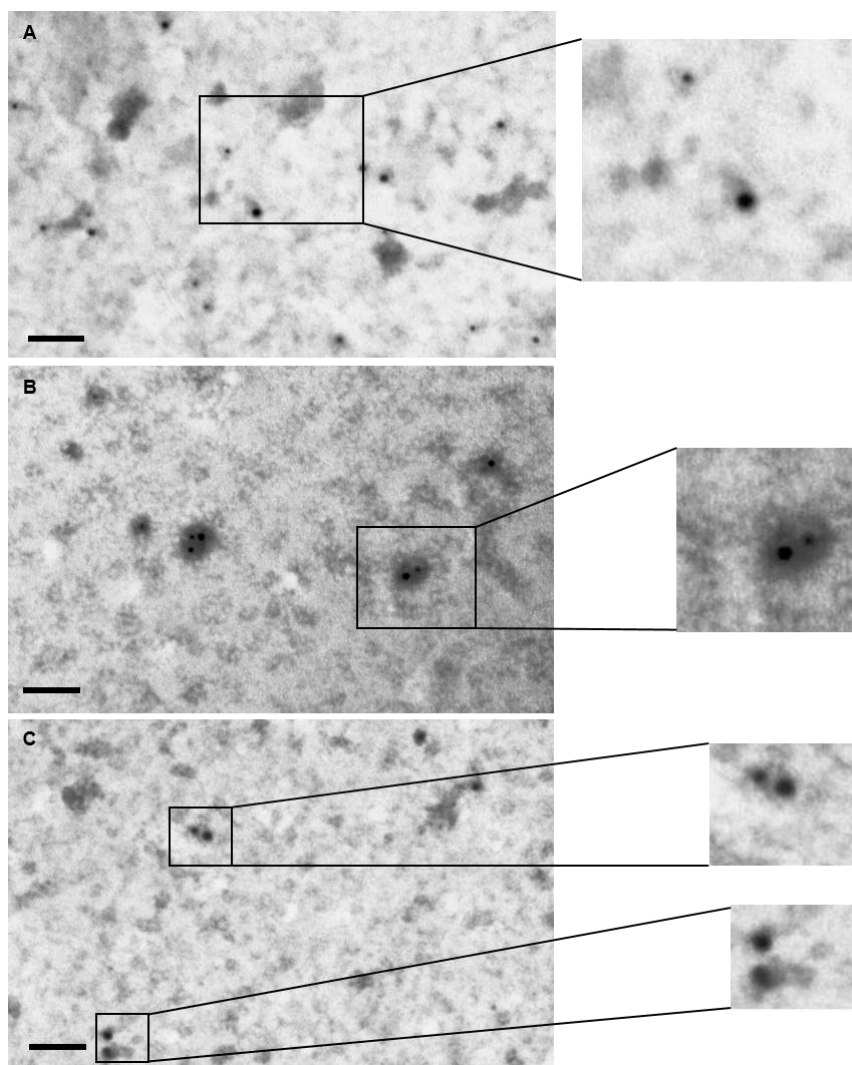
Para além das imunodeteções foi feita uma colocalização das proteínas modeladoras do processo de mineralização vascular em amostras de FMCs isolados de *pool* de indivíduos saudáveis e em FMCs isolados de *pool* de doentes com CKD em estadio 5. Nomeadamente, as amostras utilizadas foram a amostra FMC CTRpool e a amostra FMC CKDpool5.

Pretendeu-se detetar a presença da Fetuina-A e GRP nestas amostras humanas de FMCs. Para isso utilizaram-se anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro detetáveis por TEM. Cada anticorpo secundário, neste caso dois, foi conjugado com nanopartículas de diâmetros diferentes. Dois antígenos são assim detetados ao mesmo tempo, na mesma amostra, ou seja, a colocalização compreende duas imunodeteções sequenciais.

Nas **Figuras III.9 e III.10** está representada a colocalização realizada na amostra FMC CTRpool e na amostra FMC CKDpool5, respetivamente.

Na **Figura III.9** em (A) FMC CTRpool, amostra de FMCs de uma *pool* de indivíduos saudáveis, foi alvo de marcação pelas combinações dos anticorpos rabbit anti-tGRP/ anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm e dos anticorpos mouse anti-fetH (anticorpo para a fetuina-A humana)/ anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm. A amostra apresenta pouco material e marcação dispersa. Na ampliação conseguimos distinguir nanopartículas de diâmetros diferentes.

Nas imagens (B) e (C) temos dois controlos distintos à experiência de colocalização para a amostra de FMCs controlo, FMC CTRpool. Em (B) temos o controlo designado por FMC CTRpool-fetH incubado com a combinação anticorpos rabbit anti-tGRP / anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm e com o anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário mouse anti-fetH. A imagem apresenta pequenos aglomerados de material marcados com nanopartículas de tamanhos distintos visíveis na ampliação. Na imagem (C) temos o segundo controlo designado por FMC CTRpool-GRP incubado com a combinação anticorpos mouse anti-fetH/ anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm e com o anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário rabbit anti-tGRP. A presente imagem apresenta pouco material marcado com partículas de ouro do mesmo tamanho em ambas as ampliações.



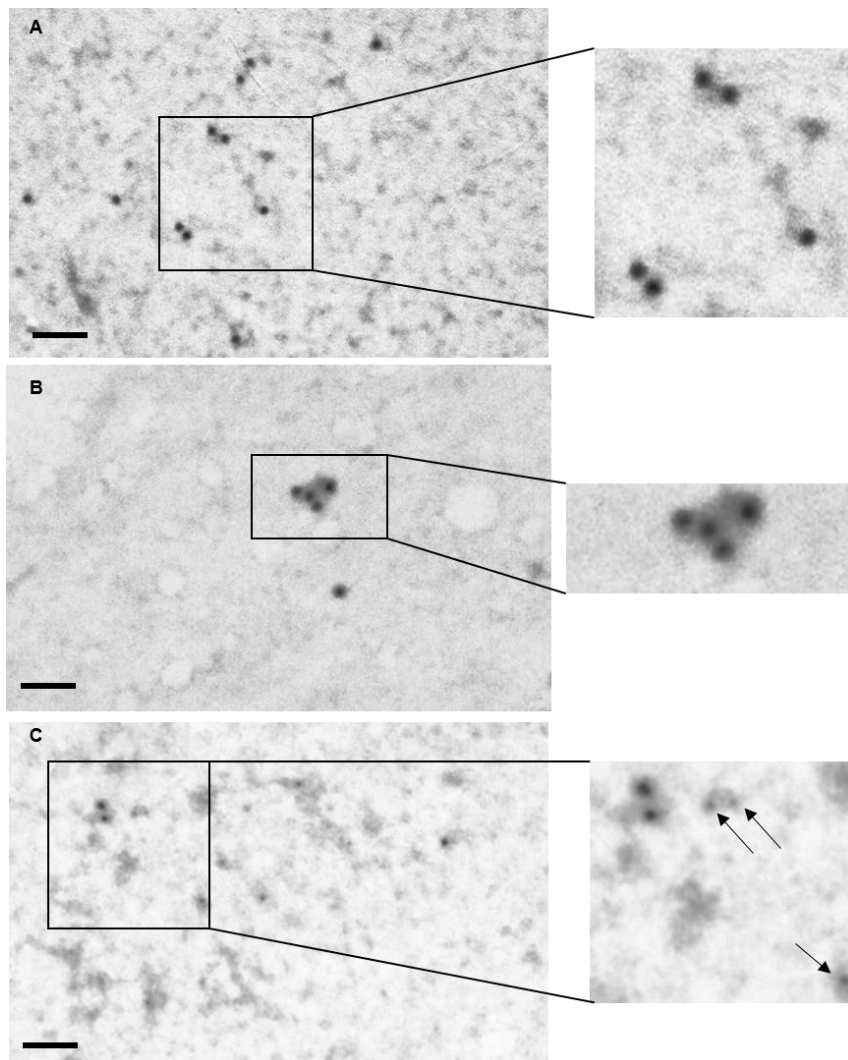
**Figura III.9 - Colocalização em TEM de Proteínas Modeladoras da Mineralização Vascular – Fetuina-A Humana e GRP – em FMCs Biológicos Isolados de Indivíduos Saudáveis.** (A) Amostra de FMCs isolados do soro de uma *pool* de indivíduos saudáveis, FMC CTRpool, marcada com os anticorpos rabbit anti-tGRP, mouse anti-fetH e respetivos anticorpos secundários. Pouco material e marcação dispersa. (B) FMC CTRpool-fetH corresponde a um controlo em que se incubou a amostra com os anticorpos rabbit anti-tGRP e anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas de Au-10nm mais o anticorpo secundário anti-mouse igG acoplado a nanopartículas de Au-5nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário mouse anti-fetH. Apresenta pequenos aglomerados de material marcados com nanopartículas de tamanhos distintos. (C) FMC CTRpool-GRP corresponde a um controlo em que se incubou a amostra com os anticorpos mouse anti-fetH e anti-mouse acoplado a nanopartículas de Au-5nm mais o anticorpo secundário anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas de Au-10nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário rabbit anti-tGRP. Apresenta pouco material marcado com partículas de ouro do mesmo tamanho. Barra de escala: 200nm.

Na **Figura III.10**, em (A) está representada a amostra de FMCs isolados do soro de uma *pool* de doentes com CKD em estadio 5, FMC CKDpool5, que foi marcada pelas combinações de anticorpos rabbit anti-tGRP/ anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm e de anticorpos mouse anti-fetH/ anticorpo secundário anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm. Apresenta pouco material e marcação dispersa. Na ampliação vemos nanopartículas de diâmetros iguais.

Nas imagens (B) e (C) temos dois controlos distintos. Em (B) temos o controlo designado por FMC CKDpool5-fetH incubado com a combinação de anticorpos rabbit anti-tGRP/ anti-rabbit igG

acoplado a nanopartículas de Au-10nm e com o anticorpo anti-mouse igG acoplado a nanopartículas de Au-5nm na ausência do seu respetivo anticorpo mouse anti-fetH. A imagem apresenta um pequeno aglomerado de material marcado com nanopartículas de diâmetro aparentemente similar.

Na imagem (C) temos o segundo controlo designado por FMC CKDpool5-GRP incubado com a combinação anticorpos mouse anti-fetH/ anti-mouse igG acoplado a nanopartículas Au-5nm e com o anticorpo anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas Au-10nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário rabbit anti-tGRP. A imagem apresenta material marcado com partículas de ouro de tamanho distinto. Indicadas pelo círculo encontram-se as partículas de tamanho superior e indicadas pelas setas as nanopartículas que aparentam ser inferiores em tamanho ou pelo menos no plano da imagem estão mais ténues.



**Figura III.10 - Colocalização em TEM de Proteínas Modeladoras da Mineralização Vascular – Fetuina-A Humana e GRP – em FMCs Biológicos Isolados de Doentes com CKD.** (A) Amostra de FMCs isolados do soro de uma *pool* de doentes com CKD em estadio5, FMC CKDpool5, marcada com os anticorpos rabbit anti-tGRP, mouse anti-fetH e respetivos anticorpos secundários. Apresenta pouco material, marcação dispersa e nanopartículas do mesmo tamanho. (B) FMC CKDpool5-fetH corresponde a um controlo em que se incubou a amostra com anticorpo rabbit anti-tGRP com o anticorpo secundário respetivo mais o anticorpo secundário anti-mouse igG acoplado a nanopartículas de Au-5nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário mouse anti-fetH. Pequeno aglomerado com nanopartículas do mesmo diâmetro. (C) FMC CKDpool5-GRP corresponde a um controlo em que se incubou a amostra com o anticorpo mouse anti-fetH e respetivo anticorpo secundário mais o anticorpo secundário anti-rabbit igG acoplado a nanopartículas de Au-10nm na ausência do seu respetivo anticorpo primário rabbit anti-tGRP. Pouco material com nanopartículas de tamanho diferente. Setas indicam as partículas mais pequenas. Barra de escala: 200nm.



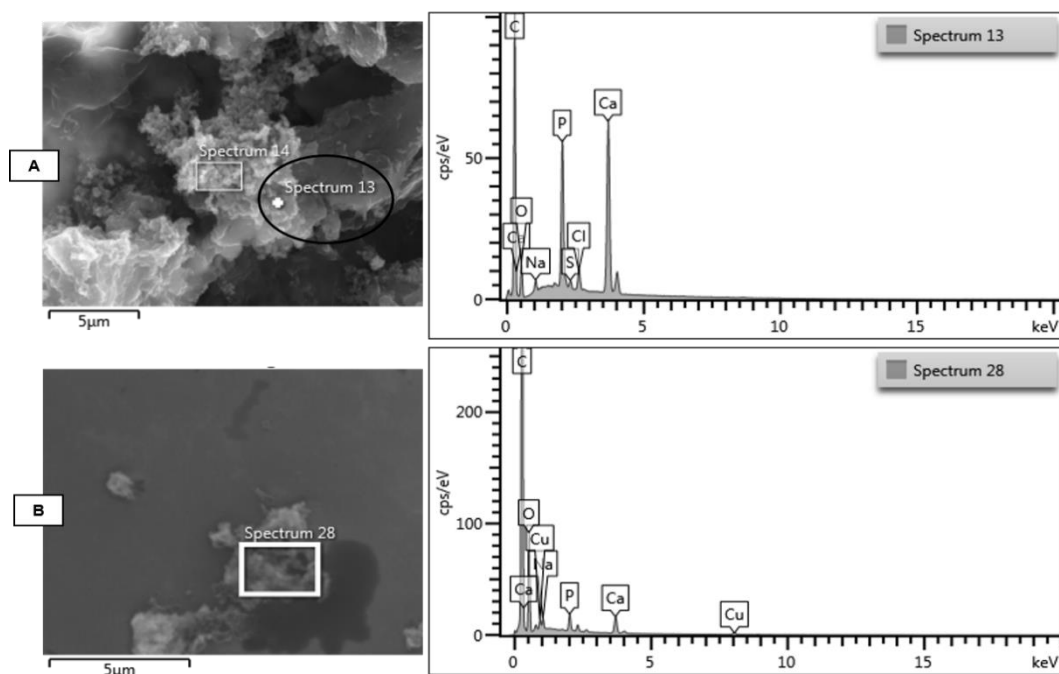
### **III.7. SEM-EDS e Microanálise de FMCs Biológicos Isolados de Doentes com CKD, de Indivíduos Saudáveis e de BCPs sintéticos. Presença de Fósforo e Cálcio nas Amostras Detetados por SEM-EDS**

Para confirmação de resultados obtidos em TEM procedemos à análise de algumas amostras por SEM e EDS. O SEM utilizado tinha um sistema de EDS acoplado o que permitiu a microanálise ou análise pontual das amostras. Em seguida encontram-se as imagens quer obtidas por SEM quer obtidas pelo sistema de EDS. Bem como os espectros e mapas elementares respetivos.

As amostras analisadas foram a amostra de FMCs isolados do soro de um doente com CKD em estadio 5, amostra FMC CDK5; a amostra de FCMs isolados do soro de um indivíduo saudável (controlo), amostra FMC CTR2 e por último procedeu-se à análise da amostra *pellet* de BCP sintético produzido na presença de três proteínas modeladoras da mineralização – fetA, stGRP e MGP – designada por BCP+ Mix Proteínas.

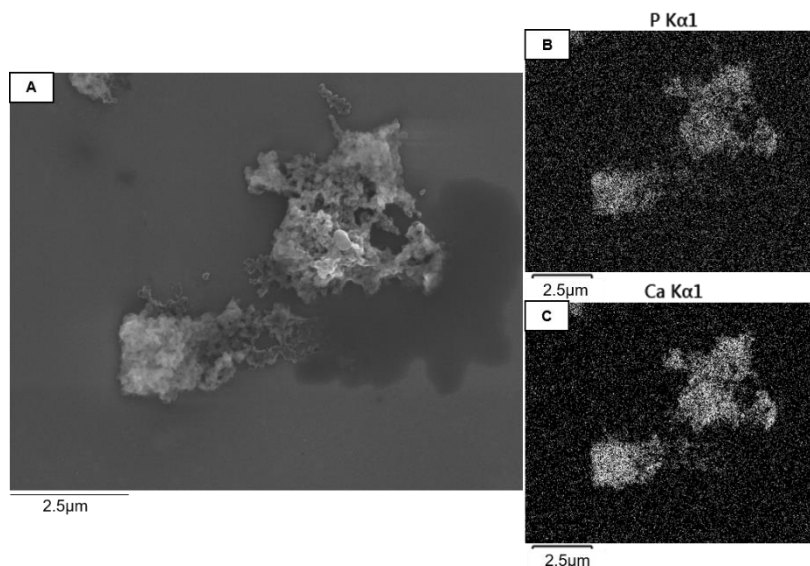
Do *pellet* de BCP sintético + Mix Proteínas analisado obtiveram-se vários espectros elementares das áreas ou pontos nas imagens selecionadas para o efeito (**Figura III.11**) e mapas elementares por EDS (**Figura III.12**). Pretendeu-se com estas análises confirmar a presença de material calcificado através da identificação dos elementos cálcio e fósforo nas amostras.

**Na Figura III.11** temos representadas duas imagens (A) e (B) da mesma amostra de BCP sintético + Mix Proteínas, mas de zonas diferentes, e seus respetivos espectros elementares. Cujos foram obtidos através do pequeno varrimento da amostra no caso de (B) e na incidência sobre um ponto no espectro 13 (*Spectrum 13*) em (A). Em (A) verificamos na imagem por SEM que existe material com aspeto amorfo e emaranhado sobre si mesmo. No seu espectro verificamos a presença de cálcio e fósforo. Sendo a presença de cálcio mais notória. Na imagem (B) verificamos que a estrutura escolhida contém menos material. Neste caso o espectro 28 (*Spectrum 28*) mostrou a presença de fósforo e de cálcio na sua composição elementar, no entanto ambos os elementos estão presentes em menores quantidades que em (A).



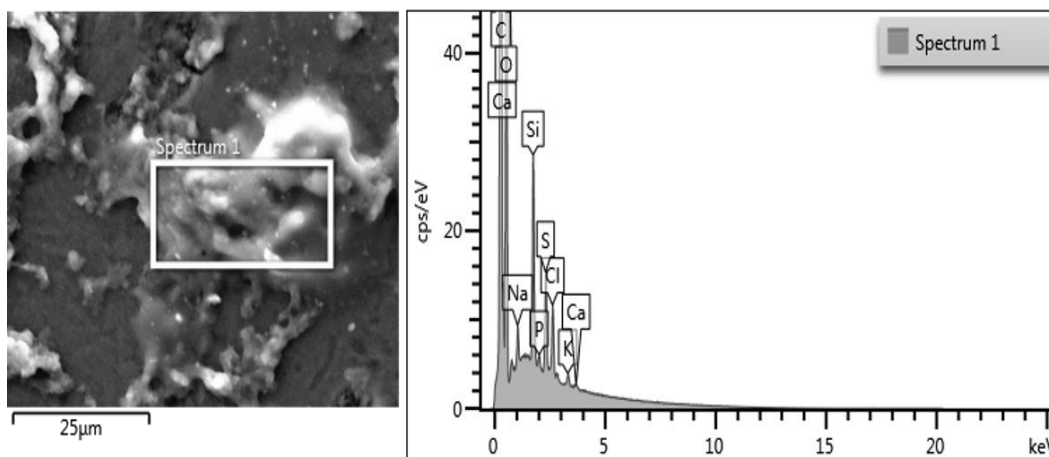
**Figura III.11 - Morfologia de BCP Sintético Produzido na Presença de GRP, fetA e MGP por SEM e Seus Respetivos Espectros Elementares obtidos por EDS.** (A) representa o espectro elemental EDS do ponto circundado na imagem obtida por SEM (Spectrum 13). Presença de Cálcio e Fósforo na amostra. Cálcio ligeiramente mais elevado. (B) outro espectro EDS e sua respetiva imagem por SEM de outro local da mesma amostra de BCP sintético + Mix Proteínas (Spectrum 28). Presença confirmada de Cálcio e Fósforo mas com picos menos notórios no espectro elemental em relação à zona analisada em (A).

Na **Figura III.12** estão representados os mapas elementares obtidos por EDS e que são sobreponíveis à imagem respetiva obtida por EDS do BCP + Mix Proteínas. Em (A) temos a imagem por EDS da estrutura analisada que apresenta um aglomerado de material. Em (B) e (C) temos os mapas elementares do fósforo e do cálcio, respetivamente. Em ambos os mapas verificamos a presença de sinal (áreas mais esbranquiçadas visíveis) para estes elementos. O sinal é mais intenso em (C).



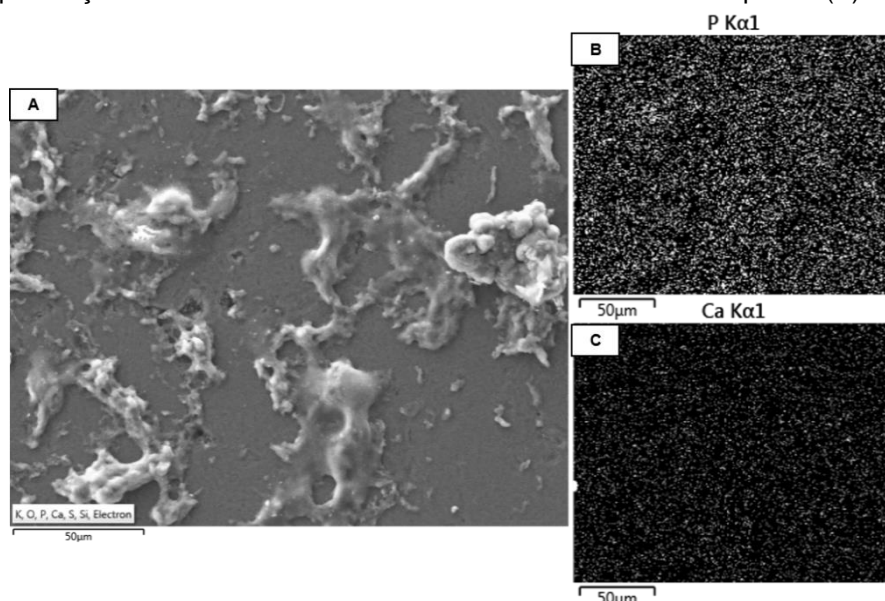
**Figura III.12 – Morfologia de BCP Sintético Produzido na Presença de GRP, FetA e MGP e Mapeamento Elemental por EDS.** Amostra *pellet* de BCP sintético + Mix Proteínas. (A) Imagem obtida por SEM-EDS da estrutura alvo de mapeamento. (B) Mapa EDS de fósforo e (C) Mapa EDS de cálcio referentes a (A).

Na **Figura III.13** está representado um espectro elementar da estrutura analisada da amostra de FMCs isolados de um indivíduo saudável, FMC CTR2, e respetiva imagem obtida por EDS. O espectro mostra a presença de dois pequenos picos de cálcio. No entanto o pico mais elevado encontra-se numa zona de ruído e pode estar mascarado pela presença de outros elementos próximos, como o magnésio (Otero et al., 2014). O outro pico é bastante pequeno bem como o pico do fósforo. Na imagem que deu origem ao presente espectro verificamos a presença de algum material aglomerado. A análise incidiu sobre a área destacada.



**Figura III.13 - Morfologia por SEM de FMCs Biológicos Isolados do Soro de um Indivíduo Saudável e seu Respetivo Espectro Elementar obtido por EDS.** Amostra FMC CTR2, amostra controlo saudável. Imagem da Amostra FMC CTR2 obtida por SEM e respetivo espectro elementar EDS (*Spectrum 1*). Presença dos elementos de interesse cálcio e fósforo.

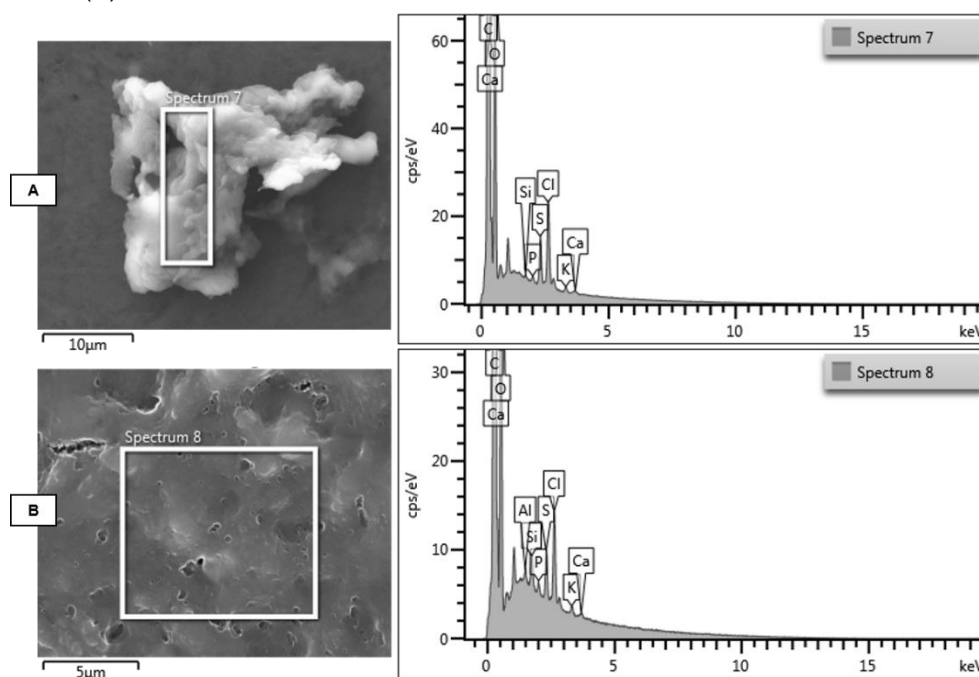
Ainda referente a microanálise de FMC CTR2, na **Figura III.14** está representada uma imagem (A) obtida por EDS e seus respetivos mapas referentes aos elementos fósforo (B) e cálcio (C). No entanto apesar de nos espectros terem sido identificados picos referentes a estes elementos nos mapas EDS a sua presença não foi detetada. Não existe sinal em nenhum dos espectros (B) e (C).



**Figura III.14 - Morfologia de FMCs Biológicos Isolados do Soro de um Indivíduo e Mapeamento Elementar por EDS.** (A) Imagem por SEM-EDS da amostra analisada para obtenção dos Mapas. (B) Mapa EDS de fósforo e (C) mapa EDS de cálcio referentes a (A). Ausência de sinal de ambos os elementos nos seus mapas EDS.

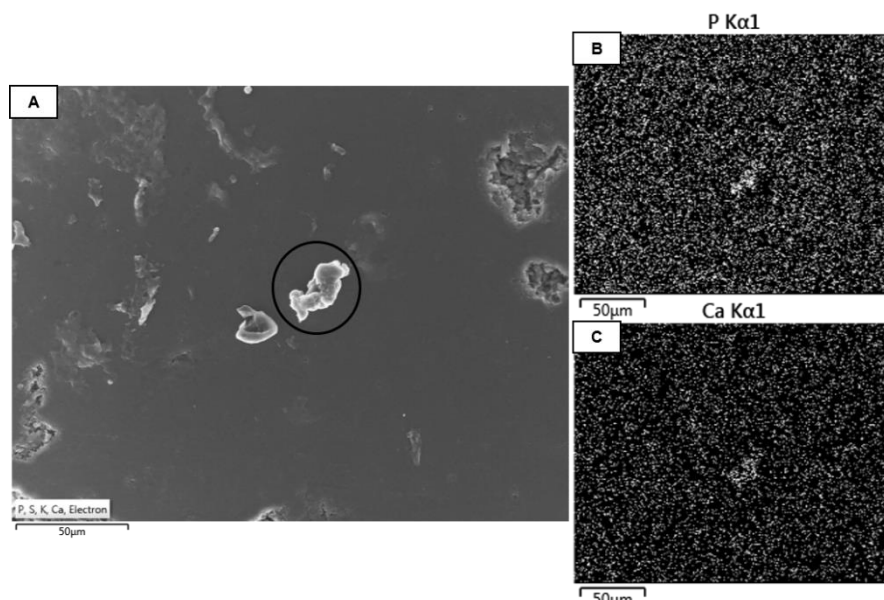
Por fim, as **Figuras III.15 e III.16** referem-se à amostra de FMCs isolados de soro de um doente com CKD em estadio 5, amostra FMC CKD5.

Na **Figura III.15** temos representadas duas imagens SEM de estruturas selecionadas e os seus respectivos espectros elementares obtidos por EDS. A imagem (A) e respetivo espectro dizem respeito a um aglomerado de material onde se varreu a área destacada para obtenção do espectro. Encontramos a presença dos elementos fósforo e cálcio. Em (B) a estrutura refere-se a outra zona da mesma amostra e o seu espectro apresenta picos para ambos os elementos e os mesmos são ligeiramente maiores que os presentes em (A)



**Figura III.15 - Morfologia por SEM de FMCs Isolados de um Doente com CKD e Seus Respetivos Espectros Elementares obtidos por EDS.** Amostra de FMC biológico isolado de soro de um doente CKD estadio 5, FMC CKD5. (A) representa o espectro elementar EDS da área destacada na imagem respetiva obtida por SEM (*Spectrum 7*). (B) outro espectro EDS e sua respetiva imagem por SEM de outro local da mesma amostra FMC CKD5 (*Spectrum 8*). Ambos os espectros assinalam a presença dos elementos de interesse, fósforo e cálcio.

Na **Figura III.16** temos uma imagem (A) da amostra de FMCs biológicos isolados do soro de um doente com CKD em estadio 5, FMC CKD5, obtida por EDS e os seus mapas elementares referentes ao cálcio e ao fósforo. O mapa EDS do fósforo (B) mostra uma ligeira mancha branca sobreponível à estrutura circundada em (A) indicativa da presença deste elemento na estrutura analisada. No mapa EDS do cálcio (C) também verificamos o mesmo tipo de sinal sobreponível ao mapa EDS (B) e à imagem (A) que lhes deu origem.



**Figura III.16 - Morfologia de FMCs Biológicos Isolados do Soro de um Doente com CKD e Mapeamento Elemental por EDS.** (A) Amostra de FMCs biológicos isolados do soro de um doente CKD em estadio 5, FMC CKD5. Apresenta a estrutura alvo de análise para mapeamento (círculo). (B) Mapa EDS do elemento fósforo e (C) mapa EDS de cálcio (C) referentes a (A). Ambos os mapas apresentam sinal para a presença dos dois elementos referidos.

### III.8. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR) de FMCs Biológicos Isolados do Soro de uma *Pool* de Doentes CKD. Identificação do Grupo Fosfato

FMCs biológicos de Soros de uma *pool* de doentes CKD que se encontravam todos no mesmo estadio da doença foram analisados por FTIR.

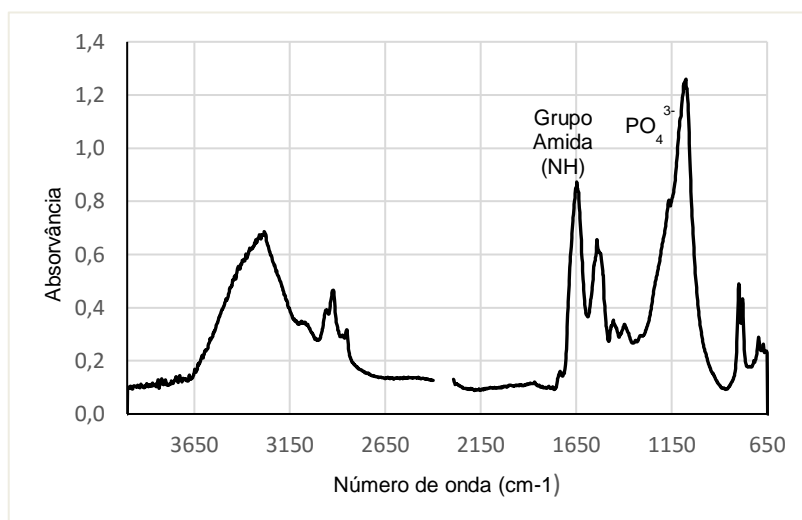
A amostra encontrava-se liofilizada e por isso no estado sólido. Foi prensada entre as duas células de diamante do microFTIR.

Foram feitos dois espectros FTIR de referência, um relativamente a uma amostra de BCP sintético e outro relativo a uma amostra de HA. Resultados não apresentados. Ambos os espectros de referência apresentaram bandas idênticas e características às bandas apresentadas pelos espectros dos FMCs biológicos para o grupo fosfato apresentados a seguir.

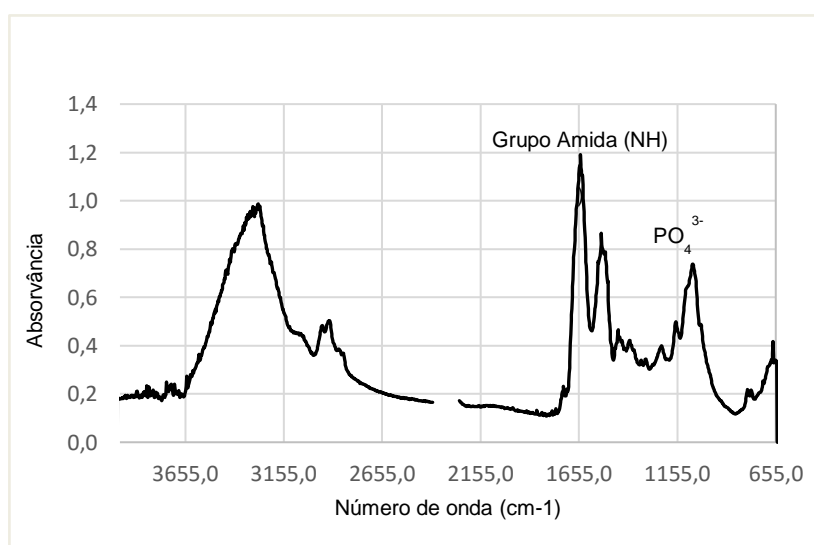
Foram analisadas duas zonas distintas da amostra de FMCs biológicos derivados do soro de doentes CKD. Nas **Figuras III.17 e III.18** estão representados os espectros dessas regiões.

Foi possível confirmar a presença de fosfato, pois ambos os espectros apresentam bandas de absorção características deste grupo químico entre os 1000 e os 1100  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros apresentam ainda bandas que confirmam a presença de proteínas pelas vibrações identificadas como sendo de grupos amida (NH) entre os 1460 e os 1530  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente. As bandas entre os 2600 e os 3600  $\text{cm}^{-1}$  são características da água (Berzina-Cimdina, 2012).



**Figura III.17 – FTIR de uma Região da Amostra de FMCs Biológicos Isolados do Soro de uma Pool de Doentes CKD no mesmo Estadio da Doença.** Espectro correspondente com as bandas dos fosfatos e dos grupos Amida assinalados. Maior absorvância para o Fosfato que para o Grupo Amida.



**Figura III.18 - FTIR de uma Outra Região da Amostra de FMCs Biológicos Isolados do Soro de uma Pool de Doentes CKD no mesmo Estadio da Doença.** Espectro correspondente com as bandas dos fosfatos e dos grupos Amida assinados. Maior absorvância para a banda do grupo Amida relativamente à banda dos fosfatos.

### III.9. Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES). Presença mais Elevada para o Elemento Cálcio

Analizamos a mesma amostra da análise FTIR referente a FMCs de uma *pool* de doentes com CKD. Após a sua análise foi obtida uma quantificação dos elementos fósforo e cálcio contidos na amostra.

Os nossos resultados contêm um erro associado de 5%, uma vez que o branco usado na experiência continha 0,05mg/ml de cálcio. Verificamos que existe uma maior concentração de cálcio relativamente ao elemento fósforo. A concentração de cálcio foi de 20mg/ml e a concentração de fósforo foi de 0,5mg/ml.

#### IV. Discussão e Conclusões

Esta tese teve como um dos seus objetivos contribuir para o estudo dos mecanismos de calcificação vascular através da utilização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de varrimento. Para isso foram utilizados tecidos de fragmentos de aorta cultivados em condições controle e mineralizantes e suplementados com rGRP ou stGRP. Este modelo *ex vivo* utilizado para o estudo da VC foi previamente otimizado e caracterizado a nível molecular e histológico (Viegas et al., 2015). O modelo tridimensional de cultura de fragmentos da aorta utilizado (Viegas et al., 2015) apresenta vantagens inerentes à manutenção das propriedades de contractilidade das VSMCs residentes em cultura. Além disso, a estrutura e propriedades da ECM também se mantêm, conforme proposto (Shroff et al., 2013) para tecidos cultivados sob diferentes condições como as utilizadas na presente dissertação. Deste modo conseguiu-se criar um sistema *ex vivo* que permite estudos mais próximos do que acontece *in vivo* devido à manutenção da ECM relativamente aos estudos com VSMCs em monocamada. Ou seja, pretendia-se uma análise ultraestrutural e caracterização morfológica dos tecidos por microscopia eletrônica do processo de mineralização vascular e ao mesmo tempo avaliar o efeito da presença da GRP e da influência da carboxilação dos seus resíduos Glu (para Gla) (Viegas et al., 2015).

Na avaliação da evolução temporal do tecido em cultura *ex vivo* foram analisadas amostras recolhidas ao longo do tempo nas várias condições de cultura. Em todas as amostras analisadas foi detetada a presença de calcificações. No controle, neste caso, referimo-nos à condição em que os tecidos foram colhidos e cultivados em meio normal, sem suplementação proteica e sem adição de fosfato de cálcio, verificamos a presença de pequenos núcleos de calcificação com aspeto amorfo. Estes são somente visíveis (na forma de fosfato de cálcio inorgânico) em algumas vesículas, como descrito anteriormente (Kapustin et al., 2011), o que não acontece na condição mineralizante onde se detetaram cristais no interior e exterior das MVs. No caso da suplementação com stGRP os tecidos apresentaram uma calcificação mais amorfa, com estruturas menos definidas que as encontradas na condição mineralizante. Com a rGRP também se verifica esta conclusão. No entanto se compararmos as agulhas visíveis dentro das MVs nesta condição com as agulhas de HA da condição stGRP verificamos que os cristalitos em formato de agulha são menos definidos na presença da stGRP.

Existiu degradação da elastina nos tecidos analisados por TEM, em qualquer das condições. Esta degradação é indicativa de processo de calcificação e pode potenciar o mesmo na medida em que funciona como centro de nucleação da deposição mineral (Paloian e Giachelli, 2014, Shroff et al., 2013, Kapustin et al., 2011).

Outro objetivo desta dissertação de mestrado foi estudar a associação das proteínas MGP, GRP e fetA descritas como fazendo parte de um sistema inibidor da calcificação vascular *in vivo*, através da formação de um complexo proteico contendo mineral de CaP e presente na circulação. Em doentes com CKD, concentrações elevadas de Ca e P dão origem à formação de FMCs em circulação tendo como consequência a diminuição dos níveis de fetA livre e aumentando assim a propensão para a calcificação na parede vascular (Viegas et al., 2015, Hamano et al., 2010).

Para avaliar o efeito das proteínas na formação dos minerais de CaP (BCPs) e na sua maturação foi feita uma experiência com amostras de *pellets* de BCPs sintéticos incubados com cada

uma destas proteínas e incubados simultaneamente com uma mistura das três. Esta experiência permitiu tirar ilações sobre a morfologia e interação dos BCPs com as proteínas.

Em qualquer condição foram encontradas diferenças no processo de calcificação, embora com algumas proteínas, como no caso da stGRP, essa alteração tenha sido mais notória, bem como na presença da mistura de todas as proteínas (MGP/stGRP/fetA). Ou seja, pelos nossos resultados concluímos que o processo de formação do mineral de CaP varia com o tipo de proteína ou sua combinação.

De forma sucinta, na condição em que os BCPs foram sintetizados na ausência de proteínas verificamos a existência de um precipitado em forma de teia bastante caraterístico da presença de HA.

Algumas das estruturas encontradas nas restantes condições são similares às obtidas por Pasch *et al.*, às obtidas por Jahnen-Dechet *et al.* na sua análise por TEM de CPPs sintéticas e isoladas de doentes e às encontradas por Aghagolzadeh *et al.* referentes às CPPs encontradas nas VSMCs (Aghagolzadeh *et al.*, 2016, Pasch *et al.*, 2012, Jahnen-Dechet *et al.*, 2011). As CPPs podem ser CPP1s em que se apresentam como estruturas mais arredondas e de material amorfo que representam uma transição mais lenta até se formar mineral cristalino. As CPP2s são caraterizados pela presença de cristais em formato de agulha semelhantes aos BCPs sintetizados na ausência de proteínas.

Nos BCPs sintetizados na presença da GRP gamacarboxilada (que é a stGRP) verificámos a presença de cristalitos e de aglomerados com aspeto globular. A presença deste material menos definido e mais amorfo (CPP1) permite-nos sugerir uma certa interação com a GRP gamacarboxilada na ligação ao cálcio e ao mineral em formação conforme sugerido em estudos anteriores. Sendo a forma carboxilada da GRP a que tem maior capacidade e mais afinidade para se ligar ao cálcio e ao mineral de fosfato de cálcio através dos resíduos Gla em vez dos resíduos Glu presentes na rGRP (Viegas *et al.*, 2014).

No caso da presença da rGRP nenhuma interação parece ter existido com o mineral embora verifiquemos dois tipos de material presentes, um mais denso e portanto que poderá ser material com presença de CaP (CPP2) e um de menor densidade respeitante a algum tipo de matriz proteica.

Na condição da fetA as imagens TEM apresentaram estruturas em muito semelhantes a CPP2s. O seu material possui agulhas mais definidas, embora não individualizadas. Seria de esperar ter-se visto também para a fetA a formação de nanoagregados de proteína que ao complexarem com o fosfato de cálcio não formassem cristalitos de HA (Aghagolzadeh *et al.*, 2016, Dautova *et al.*, 2014)

Em suma, para as condições stGRP e mistura das proteínas obtivemos estruturas idênticas às encontradas para CPP1s. O material na condição fetA assemelhou-se por sua vez mais a uma estrutura de CPP2, ainda que de forma não muito clara. E na condição stGRP encontrámos ambas as CPPs. Embora predominem estruturas semelhantes a CPP2s quando existem proteínas presentes. (Jahnen-Dechet *et al.*, 2011, Hamano *et al.*, 2010).

O terceiro objetivo esteve focado na caraterização ultraestrutural de FMCs biológicos. Para isso foi feita uma caraterização morfológica e ultraestrutural por TEM de FMCs isolados a partir do soro de pessoas saudáveis e de doentes com CKD em diferentes estadios da doença ou em processo de hemodiálise.



Nos nossos resultados encontramos uma grande heterogeneidade de material quer entre amostras de diferentes doentes quer na mesma amostra.

Embora seja um pouco difícil estabelecer uma morfologia específica para FMCs obtidos dos controlos e de doentes com CKD conseguimos verificar que na maioria dos FMCs controlados analisados obtivemos estruturas mais amorfas e com contornos mais arredondados. Os aglomerados de material encontram-se menos alongados e menos definidos (CPP1s) que no caso dos FMCs de doentes CKD. Nas amostras de FMCs isolados do soro de doentes com CKD foram visíveis precipitados de material com algumas agulhas características de HA, de estrutura cristalina. Os cristalitos foram visíveis, ainda que não individualizados nomeadamente na amostra FMC CKD5 respeitante a FMCs isolados do soro de um doente em estadio 5 da CKD. As imagens TEM mostraram uma teia de material onde se visualizaram estruturas mais cristalinas. Estas estruturas semelhantes a agulhas poderão indicar a presença de CPP2s na amostra e consequentemente poder-se-á inferir que em doentes em estadio mais avançado de CKD encontramos CPP2s que poderão estar na causa de uma maior calcificação vascular. No entanto em amostras de FMCs de doentes CKD5 também detetámos CPP1s (Holt e Smith, 2016). A sua presença confirma-se através de estruturas mais arredondadas e em formato de aglomerados globulares (Jahnen-Dechent et al., 2011).

A presença de material menos definido nas amostras referentes a FMCs isolados de indivíduos saudáveis (controlo) relativamente ao material encontrado nas amostras de FMCs isolados do soro de doentes CKD pode relacionar-se com os níveis de proteínas inibidoras em circulação. Doentes em diálise ou em estadios mais avançados da doença têm menores níveis de FetA em circulação (Shroff et al., 2013). Assim, estas não irão originar CPP1s tão eficazmente, dando lugar preferencial à existência de CPP2s. Existe nestes casos uma maior progressão da VC com maior deposição mineral caracterizada pela presença de material mais alongado e em formato de agulhas (Holt e Smith, 2016, Pasch et al., 2012).

O estudo *in vitro* feito com os BCPs sintéticos teve ainda outra funcionalidade para além da avaliação da função inibidora das proteínas estudadas. Uma vez que os BCPs sintéticos mimetizam os FMCs biológicos foi feita uma comparação da morfologia entre estas duas entidades de origens distintas.

Para avaliar a presença de GRP, fetA outras experiências foram feitas referentes a imunodeteções e colocalizações associadas a nanopartículas de ouro, com visualização por TEM.

Conseguimos com sucesso otimizar um protocolo para imunodeteção em EM em amostras de *pellets* de BCPs sintéticos, incluindo a colocalização de duas proteínas (GRP e fetA) em amostras centrifugadas de soro humano. O “protocolo A.4” encontra-se no capítulo “Anexos” e teve por base o protocolo de Thery *et al.*, 2006.

Bleher *et al.* fizeram imunodeteção em TEM no entanto ao primeiro anticorpo conjugaram as nanopartículas metálicas, sem existir um anticorpo secundário (Bleher et al., 2008). Outros autores também elaboraram um protocolo para colocalização dupla, ou seja, para deteção de dois antígenos ao mesmo tempo, mas em cortes de células em cultura, e com a diferença de que a colocalização não consistiu em dois passos sequenciais, com duas imunodeteções independentes. Ou seja, os autores

incubaram os cortes com uma mistura dos anticorpos primários com posterior incubação de uma mistura dos anticorpos secundários respetivos (Hagiwara et al., 2010).

Schlieper *et al.* procederam a um estudo de imunodeteção de fetuina-A humana em cortes de biópsias de doentes urémicos. Embora recaia sobre o nosso tema mais uma vez foi feito em cortes e não em amostras de *pellets* centrifugados e as nanopartículas de ouro usadas foram complexadas com uma proteína A em vez de conjugadas diretamente a um anticorpo secundário (Schlieper et al., 2010).

Zlotogorski-Hurvitz *et al.* não detetaram nenhuma das proteínas mencionadas na presente tese, embora tenham procedido a uma imunodeteção em exossomas centrifugados. No final as grelhas foram embebidas em uma mistura de acetato de uranilo com metilcelulose. No nosso caso apenas procedemos a um contraste negativo com acetato de uranilo (Zlotogorski-Hurvitz et al., 2015).

Na sua imunodeteção Smith *et al.* utilizaram amostras de CPPs de doentes urémicos e amostras de CPPs sintéticos. Detetaram nos mesmos a presença de fetuina-A. No entanto a sua imunodeteção foi analisada por *CryoTEM* e não procederam a nenhuma outra imunodeteção respeitante a outras proteínas inibidoras nem a nenhuma colocação (Smith et al., 2013b).

O nosso protocolo foi o primeiro a ser elaborado em amostras em suspensão na deteção das proteínas mencionadas. Pois todos os protocolos existentes até esta data foram levados a cabo em cortes embebidos em resina.

Segundo os nossos resultados as imunodeteções funcionaram para cada uma das proteínas estudadas. Por TEM foram visíveis nanopartículas de ouro a marcarem material. Os controlos negativos elaborados para cada uma delas mostraram que quanto à especificidade o método pareceu eficiente, uma vez que não existiram partículas de ouro em plano de fundo. Ou seja, os anticorpos secundários foram específicos para os antígenos que pretendíamos detetar. Podemos inferir que existiu uma boa otimização do protocolo.

De forma geral, na colocação conseguimos distinguir a existência de nanopartículas de diferentes diâmetros, o que significa que a colocação funcionou no que diz respeito à deteção de antígenos. Conseguimos detetar dois antígenos distintos nas amostras. Detetámos a presença de fetuina-A humana e de GRP nas nossas amostras. No entanto, a visualização de partículas de diferentes tamanhos nem sempre foi fácil. Nesta experiência a especificidade pareceu comprometida uma vez que nos controlos identificámos partículas em grande número e a marcar material inespecificamente.

Para confirmar os nossos resultados obtidos por TEM no que diz respeito aos FMCs biológicos e BCPs sintéticos procedemos a uma análise morfológica dos mesmos por SEM tal como Pasch *et al.* fizeram (Pasch et al., 2012).

Em todas as imagens adquiridas por SEM conseguimos visualizar material aglomerado, com aspeto nebuloso. Nos espectros elementares todas as amostras, FMC CTR2, FMC CKD5 e BCP sintético sintetizado na presença de stGRP/MGP/fetA continham na sua constituição os elementos fósforo e cálcio.

Nos mapas EDS obtivemos sinal para a presença destes elementos nas amostras, exceto para a amostra FMC controlo que embora tenha apresentado resultados positivos para fósforo e cálcio nos espectros EDS não apresentou sinal no mapeamento elementar.

Por último, ainda no âmbito de confirmar a presença de HA adquirimos espectros de FTIR das amostras liofilizadas que nos dando bandas representativas de vibrações das ligações químicas permite inferir sobre a presença ou ausência de certos grupos funcionais (Otero et al., 2014, Berzina-Cimdina, 2012, Yavorsky et al., 2008). Para quantificação dos elementos Ca e P fizemos uma análise por ICP-AES.

Os espetros obtidos apresentaram bandas de absorção características dos fosfatos entre os 1000 e os 1100  $\text{cm}^{-1}$  (Otero et al., 2014, Berzina-Cimdina, 2012) . Pelo que podemos sugerir a sua presença na amostra de FMC controlo.

Foram feitos recentemente mais análises FTIR mas de FMCs de soros de doentes com CKD e controlos saudáveis individuais, ou seja, em vez de ser analisada uma *pool* de FMCs de vários doentes no mesmo estadio da doença foram analisados FMCs isolados provenientes de indivíduos em separado. Cada amostra refere-se a uma só pessoa e não a um conjunto delas.

Quanto à quantificação obtida por ICP-AES permitiu-nos concluir que temos muito mais cálcio presente na amostra que fósforo. Mas que ambos os elementos são constituintes da amostra FMC biológico analisada.

Resultados complementares que foram obtidos, por outros membros da equipa no CCMAR/UALG, sugerem que os FMCs/CPPs derivados do soro de doentes CKD5 apresentam níveis baixos de fetA, GRP e cristais mais desenvolvidos. A remoção dos FMCs do soro de doentes CKD mostrou ter um efeito protetor da calcificação em estudos *in vitro* de VSMCs (Viegas et al., 2017).

Os estudos *in vitro* que mimetizaram os FMCs biológicos em circulação permitiram ajudar a concluir que na presença das proteínas FetA/MGP/cGRP a deposição mineral fica comprometida. Estes estudos permitiram ainda fazer o paralelismo com os estudos *in vivo* uma vez que fomos capazes de identificar estruturas idênticas entre eles.

Assim sendo, os nossos resultados parecem sugerir um papel patogénico dos FMCs na VC, quando estamos perante casos de CKD severos. Ou seja, quando o mecanismo celular contra a deposição mineral está fortemente desregulado como na CKD, os FMCs deixam de possuir um papel protetor para passarem a desempenhar um papel citotóxico para as células.

Os FMCs poderão ser considerados como biomarcadores de grande relevância/importância na VC e na doença urémica crónica.

Futuramente, poderemos facilitar a colocalização com o uso de nanopartículas não só de tamanhos distintos como de formas geométricas distintas (Koeck e Leonard, 1996). Um anticorpo secundário poderá ser conjugado com nanopartículas de formato esférico e o outro com nanopartículas hexagonais. Quando esta técnica de conjugação de diferentes formatos de nanopartículas for funcional será certamente algo em que devemos apostar, uma vez que permite uma mais fácil distinção entre os anticorpos utilizados. Teremos de efetuar mais imunodeteções, para além dos melhoramentos na colocalização, para que possamos tirar conclusões estatisticamente significativas quanto à deteção das proteínas em estudo. Ainda para as imunodeteções poderemos diminuir os tempos de incubação com os anticorpos primários e secundários para 20 minutos em vez de 1 hora, como fizeram Zlotogorski-

Hurvitz *et al.*, 2015. Todas estas sugestões poderão agilizar e tornar as técnicas de imunodeteção mais eficazes.

No que diz respeito à evolução temporal da mineralização no modelo tridimensional de cultura para estudo da calcificação vascular e para se conseguirem obter conclusões será necessário uma maior amostragem de observações por repetição das experiências.

Quanto aos estudos com linhas de VSMCs em cultura poderemos proceder a avaliação da sua viabilidade celular quando na presença de FMCs isolados de doentes com CKD. Verificando o quanto a suplementação do meio com FMCs CKDs e consequente internalização afetam as células.

Outro estudo possível diz respeito à avaliação do efeito citotóxico dos FMCs isolados de doentes CKD, ao longo do tempo, em cultura. E o quanto esse efeito citotóxico pode ser revertido com a suplementação do meio com proteínas modeladoras da calcificação ectópica. Isto é, poder-se-á proceder a um ensaio em que se testem os efeitos da suplementação com GRP, com MGP, com FetA e com a suplementação das três proteínas ao mesmo tempo e verificar se existem diferenças na citotoxicidade e viabilidade das células e se sim qual das proteínas será a mais eficaz.

As amostras alvo de FTIR referentes cada uma a um indivíduo distinto serão estudadas e analisadas por técnica Raman, no futuro.

Pretende-se num futuro próximo, tendo em consideração as conclusões obtidas pelo nosso estudo e com mais estudos complementares, ser-se capaz de utilizar os FMCs como fins terapêuticos ao nível da calcificação vascular prevenindo a sua progressão.

## Referências Bibliográficas

- AGHAGOLZADEH, P., BACHTLER, M., BIJARNIA, R., JACKSON, C., SMITH, E. R., ODERMATT, A., RADPOUR, R. & PASCH, A. 2016. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calcioprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Atherosclerosis*, 251, 404-14.
- ASKAR, A. M. 2015. Hyperphosphatemia. The hidden killer in chronic kidney disease. *Saudi Med J*, 36, 13-9.
- BERZINA-CIMDINA, L., & BORODAJENKO, N. 2012. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*. InTech.
- BLEHER, R., KANDELA, I., MEYER, D. A. & ALBRECHT, R. M. 2008. Immuno-EM using colloidal metal nanoparticles and electron spectroscopic imaging for co-localization at high spatial resolution. *J Microsc*, 230, 388-95.
- CUI, L., HOUSTON, D. A., FARQUHARSON, C. & MACRAE, V. E. 2016. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone*, 87, 147-58.
- D'SOUZA, L., DEVI, P., SHRIDHAR, D. M. & NAIK, C. G. 2008. Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy to study cadmium-induced changes in *Padina tetrastrum* (Hauck). *Anal Chem Insights*, 3, 135-43.
- DAUTOVA, Y., KOZLOVA, D., SKEPPER, J. N., EPPLE, M., BOOTMAN, M. D. & PROUDFOOT, D. 2014. Fetuin-A and albumin alter cytotoxic effects of calcium phosphate nanoparticles on human vascular smooth muscle cells. *PLoS One*, 9, e97565.
- EGERTON, R. F. 2005. Physical Principles of Electron Microscopy. *An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer US.
- FANG, D. Y., KING, H. W., LI, J. Y. & GLEADLE, J. M. 2013. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrology (Carlton)*, 18, 1-10.
- HAGIWARA, H., AOKI, T., SUZUKI, T. & TAKATA, K. 2010. Double-label immunoelectron microscopy for studying the colocalization of proteins in cultured cells. *Methods Mol Biol*, 657, 249-57.
- HAMANO, T., MATSUI, I., MIKAMI, S., TOMIDA, K., FUJII, N., IMAI, E., RAKUGI, H. & ISAKA, Y. 2010. Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 21, 1998-2007.
- HOLT, S. G. & SMITH, E. R. 2016. Fetuin-A-containing calcioprotein particles in mineral trafficking and vascular disease. *Nephrol Dial Transplant*, 31, 1583-7.
- HOU, X. & JONES, B. T. 2000. Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd.
- JAHNEN-DECHENT, W., HEISS, A., SCHAFER, C. & KETTELER, M. 2011. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res*, 108, 1494-509.
- KAPUSTIN, A. N., CHATROU, M. L., DROZDOV, I., ZHENG, Y., DAVIDSON, S. M., SOONG, D., FURMANIK, M., SANCHIS, P., DE ROSALES, R. T., ALVAREZ-HERNANDEZ, D., SHROFF, R., YIN, X., MULLER, K., SKEPPER, J. N., MAYR, M., REUTELINGSPERGER, C. P., CHESTER, A., BERTAZZO, S., SCHURGERS, L. J. & SHANAHAN, C. M. 2015. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*, 116, 1312-23.
- KAPUSTIN, A. N., DAVIES, J. D., REYNOLDS, J. L., MCNAIR, R., JONES, G. T., SIDIBE, A., SCHURGERS, L. J., SKEPPER, J. N., PROUDFOOT, D., MAYR, M. & SHANAHAN, C. M. 2011. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res*, 109, e1-12.
- KOECK, P. J. & LEONARD, K. R. 1996. Improved immuno double labelling for cell and structural biology. *Micron*, 27, 157-65.
- KOMABA, H. & FUKAGAWA, M. 2009. Fetuin-mineral complex: a new potential biomarker for vascular calcification? *Kidney Int*, 75, 874-6.

- LEE, D. 2011. Vascular calcification: Inducers and inhibitors. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 176, 1133-1141.
- LU, K. C., WU, C. C., YEN, J. F. & LIU, W. C. 2014. Vascular calcification and renal bone disorders. *ScientificWorldJournal*, 2014, 637065.
- MATHIEU, P. & BOULANGER, M. C. 2014. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol*, 30, 982-93.
- NEACSU, C. D., GROSCH, M., TEJADA, M., WINTERPACHT, A., PAULSSON, M., WAGENER, R. & TAGARIELLO, A. 2011. Ucmaa (Grp-2) is required for zebrafish skeletal development. Evidence for a functional role of its glutamate gamma-carboxylation. *Matrix Biol*, 30, 369-78
- OTERO, V., SANCHES, D., MONTAGNER, C., VILARIGUES, M., CARLYLE, L. & ., L. J. A. M. M. J. 2014. Characterisation of metal carboxylates by Raman and infrared spectroscopy in works of art. *J. Raman Spectrosc.*, 45, 1197-1206.
- PALOIAN, N. J. & GIACHELLI, C. M. 2014. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol*, 307, F891-900.
- PAUL, A. L., MUKDSI, J. H., PETITI, J. P., GUTIÉRREZ, S., QUINTAR, A. A., MALDONADO, C. A. & TORRES, A., I. 2012. Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes. *Applications of Immunocytochemistry*. InTech.
- PASCH, A., FARESE, S., GRABER, S., WALD, J., RICHTERING, W., FLOEGE, J. & JAHNEN-DECHENT, W. 2012. Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1744-52.
- PRICE, P. A. & LIM, J. E. 2003. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex. *J Biol Chem*, 278, 22144-52.
- RAFAEL, M. S., CAVACO, S., VIEGAS, C. S., SANTOS, S., RAMOS, A., WILLEMS, B. A., HERFS, M., THEUWISSEN, E., VERMEER, C. & SIMES, D. C. 2014. Insights into the association of Gla-rich protein and osteoarthritis, novel splice variants and gamma-carboxylation status. *Mol Nutr Food Res*, 58, 1636-46.
- ROBINSON, K. N. & TERAN-GARCIA, M. 2016. From infancy to aging: Biological and behavioral modifiers of Fetuin-A. *Biochimie*, 124, 141-9.
- SAUER, G. R. & WUTHIER, R. E. 1988. Fourier transform infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase-released matrix vesicles in vitro. *J Biol Chem*, 263, 13718-24.
- SCHLIEPER, G., ARETZ, A., VERBERCKMOES, S. C., KRUGER, T., BEHETS, G. J., GHADIMI, R., WEIRICH, T. E., ROHRMANN, D., LANGER, S., TORDOIR, J. H., AMANN, K., WESTENFELD, R., BRANDENBURG, V. M., D'HAESE, P. C., MAYER, J., KETTELER, M., MCKEE, M. D. & FLOEGE, J. 2010. Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J Am Soc Nephrol*, 21, 689-96.
- SHANAHAN, C. M. 2013. Autophagy and matrix vesicles: new partners in vascular calcification. *Kidney Int*, 83, 984-6.
- SHROFF, R., LONG, D. A. & SHANAHAN, C. 2013. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 24, 179-89.
- SMITH, E. R., HANSEN, E., MCMAHON, L. P. & HOLT, S. G. 2013a. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*, 8, e60904.
- SMITH, E. R., CAI, M. M., MCMAHON, L. P., PEDAGOGOS, E., TOUSSAINT, N. D., BRUMBY, C. & HOLT, S. G. 2013b. Serum fetuin-A concentration and fetuin-A-containing calciprotein particles in patients with chronic inflammatory disease and renal failure. *Nephrology (Carlton)*, 18, 215-21.
- STOKES, D. J. 2008. Principles of SEM. *Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*. John Wiley & Sons, Ltd.
- THERY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G. & CLAYTON, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22.
- VALLAPRAGADA, V. V., INTI, G. & RAMULU, J. S. 2011. A Validated Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) Method to Estimate Free Calcium and Phosphorus

- in In Vitro Phosphate Binding Study of Eliphos Tablets. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 718-725.
- VIEGAS, C. S., SIMES, D. C., LAIZE, V., WILLIAMSON, M. K., PRICE, P. A. & CANCELA, M. L. 2008. Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *J Biol Chem*, 283, 36655-64.
- VIEGAS, C. S., CAVACO, S., NEVES, P. L., FERREIRA, A., JOAO, A., WILLIAMSON, M. K., PRICE, P. A., CANCELA, M. L. & SIMES, D. C. 2009. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *Am J Pathol*, 175, 2288-98.
- VIEGAS, C. S., HERFS, M., RAFAEL, M. S., ENRIQUEZ, J. L., TEIXEIRA, A., LUIS, I. M., VAN 'T HOOFD, C. M., JOAO, A., MARIA, V. L., CAVACO, S., FERREIRA, A., SERRA, M., THEUWISSEN, E., VERMEER, C. & SIMES, D. C. 2014. Gla-rich protein is a potential new vitamin K target in cancer: evidences for a direct GRP-mineral interaction. *Biomed Res Int*, 2014, 340216.
- VIEGAS, C. S., RAFAEL, M. S., ENRIQUEZ, J. L., TEIXEIRA, A., VITORINO, R., LUIS, I. M., COSTA, R. M., SANTOS, S., CAVACO, S., NEVES, J., MACEDO, A. L., WILLEMS, B. A., VERMEER, C. & SIMES, D. C. 2015. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35, 399-408.
- VIEGAS, C. S., MACEDO, A. L., MORAIS, R., SANTOS, L., MATOS, A. P., SILVA, A. P., NEVES, P. & SIMES, D. C. 2017. Dysregulated fetuin-mineral complexes are linked to vascular calcification in chronic kidney disease: The role of Gla-rich protein. *Ultrastruct Pathol*, 41, 78-80.
- WALLIN, R., WAJIH, N., GREENWOOD, G. T. & SANE, D. C. 2001. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev*, 21, 274-301.
- YANAGAWA, B., LOVREN, F., PAN, Y., GARG, V., QUAN, A., TANG, G., SINGH, K. K., SHUKLA, P. C., KALRA, N. P., PETERSON, M. D. & VERMA, S. 2012. miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 144, 256-62.
- YAVORSKYY, A., HERNANDEZ-SANTANA, A., MCCARTHY, G. & MCMAHON, G. 2008. Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis - analytical approaches and challenges. *Analyst*, 133, 302-18.
- ZLOTOGORSKI-HURVITZ, A., DAYAN, D., CHAUSHU, G., KORVALA, J., SALO, T., SORMUNEN, R. & VERED, M. 2015. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J Histochem Cytochem*, 63, 181-9.





## Anexos

**Tabela A.6 - Reagentes para Preparação de PBS.**

<b>Quantidades de Reagentes para preparação de PBS (150mL)</b>	
<b>Cloreto de sódio</b>	1,200g
<b>Cloreto de Potássio</b>	0,030g
<b>Fosfato de sódio Heptahidratado</b>	0,238g
<b>Fosfato de potássio monobásico</b>	0,036g

## Protocolo A.1 – Preparação e Corte das Amostras para SEM e TEM

1. Antes da experiência, fixar as células/amostra com gluteraldeído 3% em solução 0,1M cacodilato de sódio, a pH 3, a noite toda, a 4°C.
2. No dia seguinte, manter as amostras numa solução de cacodilato de sódio a 0,1M a 4°C.
3. Lavar as amostras uma vez em tampão cacodilato de sódio.
4. Preparar uma solução de 0,5g de Agar em 25mL de água desionizada, solução a 2%.
5. Embeber as amostras molde no agar a 2% num tubo *eppendorf*.
6. Pôr as amostras numa centrífuga a 45-50°C por 30min para infiltração do agar no material.
7. Deixar o agar solidificar no frio por 5-10min.
8. Cortar o agar já com a amostra molde.
9. Lavar 3 vezes com solução de cacodilato de sódio a 0,1M. Com duração de 10min por lavagem.
10. Colocar as amostras, por 1h, em tetróxido de ósmio 2% e cacodilato 0,2M (1:1).
11. Lavar mais 3 vezes cada amostra na resina, com a solução de cacodilato a 0,1M. Repetir 3 vezes, 10 min cada.
12. Remover o cacodilato de sódio e lavar as amostras com tampão ácido acético- acetato de sódio a 0,1M, pH 5. Lavar 3 vezes nesta solução com duração de 10min cada.
13. Colocar as amostras em álcool a 70%, a noite toda no frio.
14. Cortar as amostras em pedaços menores.
15. Lavar 3 vezes com etanol a 70%, 10min cada lavagem.
16. Lavar 2 vezes com etanol a 95%, 10min cada lavagem.
17. Lavar 3 vezes com etanol a 100%, 10min cada lavagem.
18. Tratar 2 vezes com óxido de propileno, 15 minutos cada lavagem.
19. Adicionar às amostras uma solução de óxido de propileno:epon (resina) 1:1, por 1h, segundo Mollnhaeur.
20. Deixar as amostras em Epon, no frio durante a noite e cobertas com película de *parafilm*.
21. Identificar bem as amostras.
22. Fazer os moldes das amostras em Epon e deixar na estufa por 2 dias, a 67°C.
23. Cortar os moldes contendo as amostras embebidas com o Ultramicrotomo.
24. Fazer ultracortes com cerca de 50nm.
25. Preparar as grelhas para TEM e as lâminas para MO marcadas com azul de toluidina.
26. Visualizar nos microscópios adequados e recolher a informação no formato de imagem.
27. Tratar as imagens de forma adequada.

*Protocolo elaborado por Rute Miriam Santos Morais no âmbito da dissertação de mestrado sob orientação da professora Anjos Macedo e professor António Matos.*

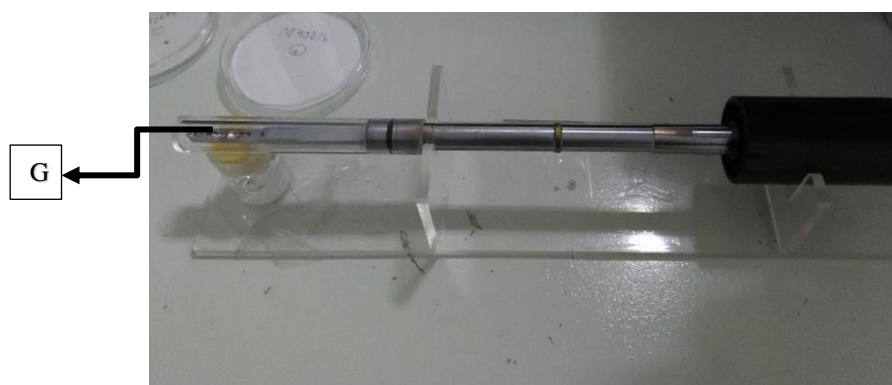
## Protocolo A.2 – Aquisição e Manuseamento do TEM

1. Ligar o microscópio eletrónico de transmissão se estiver desligado. Fazendo rodar a chave **(A)** no painel do lado esquerdo.
2. 20min a ½ h depois Verificar que a luz “Ready” **(B)** no painel está acesa para se poder prosseguir.
3. Ligar a alta tensão **(F)**.
4. Verificar que o “Beam Current” **(C)** é um pouco mais de metade (46) que a voltagem de aceleração do eletrões (80kW).
5. Rodar lentamente o botão D (filament) até à espera. Verificar se o beam current **(C)** aumenta. Se não amentar, solicitar ajuda.
6. Verificar se vemos luz no microscópio.
7. Se não há luz abrir o condensador rodando o botão “Brightness” **(E)** no sentido dos ponteiros do relógio para espalhar a luz no ecrã do microscópio.
8. Se continuar a não ver luz, reduza a ampliação e movimente a amostra.
9. Se ainda assim não obtiver luz, peça ajuda.



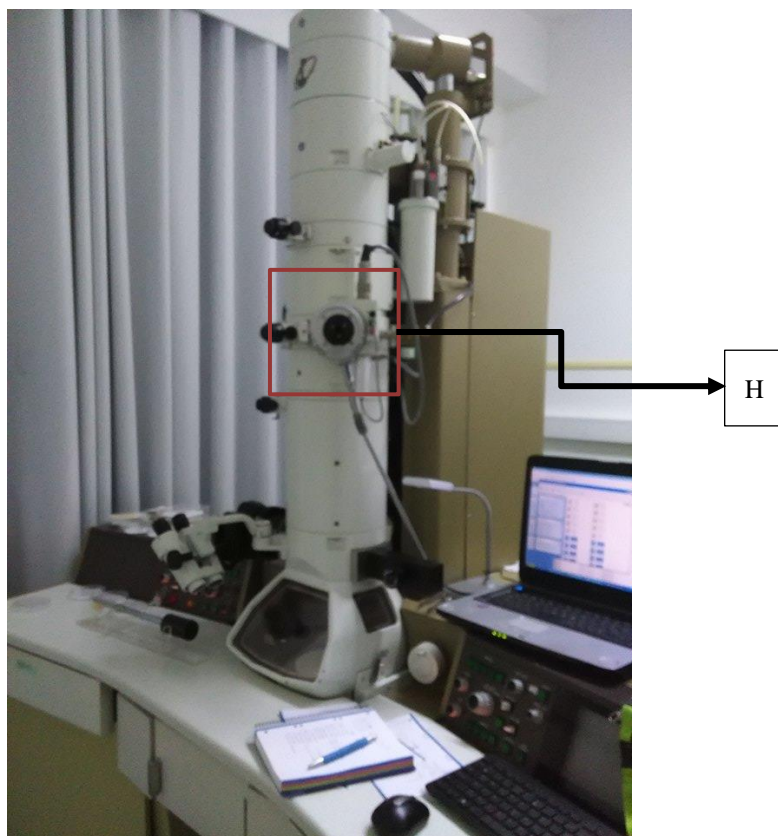
**Figura A.19 - Painel Esquerdo do TEM Utilizado.** Na imagem estão representados vários componentes e comandos dos quais (A) chave que liga o microscópio, (B) Luz “Ready”, (C) Beam Current, (D) botão “Filament”, (E) botão do condensador “Brightness”, **(F)** HT botão de alta tensão importantes para o bom funcionamento do microscópio e correta aquisição de imagens TEM.

10. Manusear a grelha, previamente preparada e com a amostra a analisar, com pinça.
11. Introduzi-la na ranhura respetiva **(G)** para o efeito no suporte/braço do microscópio **(Figura A.20)**.



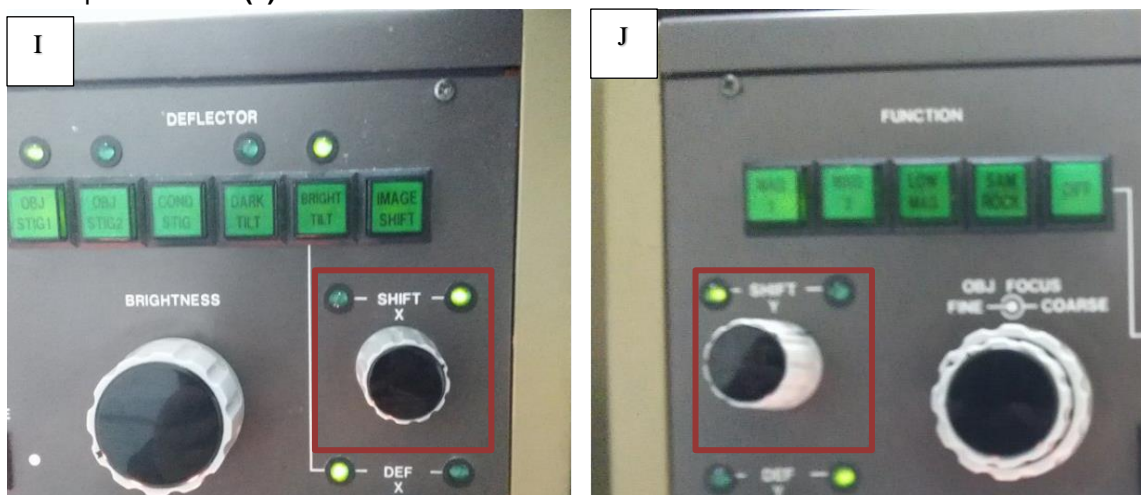
**Figura A.20 – Porta Amostras.** (G) Ranhura para colocação da grelha com a amostra a analisar.

12. Introduzir o braço com a amostra, cuidadosamente, sem o largar, até que a luz vermelha **(H)** junto ao local de inserção na coluna se acenda.
13. Esperar que a luz vermelha apague.
14. Assim que a luz apagar, sem nunca largar o braço para que não seja sugado e embata na parede do TEM danificando-se. Rodar o suporte no sentido dos ponteiros do relógio, cerca de 90º graus, desde a posição inicial e empurrar com cuidado até estar na posição adequada.



**Figura A.21 – Coluna TEM com Inserção para o Porta Amostras.** (H) – Luz da descompressão do vácuo.

14. Otimizar a luz, centrando-a com o auxílio dos botões para o efeito: um no painel esquerdo **(I)**, outro no painel direito **(J)**.



**Figura A.22 - Parafusos Macrométricos destacados pelos retângulos.** (I) Parafuso macrométrico esquerdo, “SHIFT X” e (J) parafuso macrométrico direito, “SHIFT Y”.

15. Procurar na grelha a amostra a observar com os botões macrométricos esquerdo **(K)** e direito **(L)**.



**Figura A.23 – Parafusos para Varrer a Preparação/Grelha segundo os Eixos xx e yy. (K) parafuso do painel esquerdo. (L) parafuso do painel direito.**

16. Ampliar a imagem no **(M)** “MAG1” ou **(N)** “MAG2” e focar no botão **(O)** “OBJ FOCUS”. Todos no painel do lado direito.



**Figura A.24 - Parafusos para Ampliação (M) e (N) e Focagem (O) no Painel Direito.**

17. Ajustar no monitor negro do lado direito o valor de tempo de exposição para cerca de aproximadamente 2,0 segundos. – 17,1 PA/cm<sup>2</sup>.
18. Espalhar a luz para adquirir a fotografia.

19. Introduzir máquina fotográfica associada no campo de aquisição através da roldana do lado direito  
(Figura A.25)



**Figura A.25 – Roldana do Painei Direito para Inserção da Máquina Fotográfica.**

20. Usar o pc com o *software* adequado para disparo e fotografia do ecrã adequados.

*Protocolo elaborado por Rute Miriam Santos Morais no âmbito da dissertação de mestrado sob orientação da professora Anjos Macedo e professor António Matos.*



### Protocolo A.3 – Adsorção da Amostra à Grelha Contraste Negativo para grelhas TEM

1. (Passo alternativo se necessário para obtenção de um maior volume de amostra) Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (volume variável) para cada tubo *ependorf* portador da amostra e agitar o tubo suavemente.
2. Retirar com uma micropipeta 3  $\mu\text{L}$  de cada tubo com a(s) amostra(s) a preparar para TEM previamente (ou não) diluída(s).
3. Colocar a(s) gota(s) de 3  $\mu\text{L}$  dentro duma caixa de *petri* forrada com uma tira de *parafilm* (repetir o passo consoante o número de grelhas da amostra que se pretendem preparar).
4. Retirar a(s) grelha(s) (carbono *formvar*+ cobre) do suporte das mesmas com ajuda de uma pinça.
5. Colocar a face que possui a membrana voltada para a gota de amostra (em algumas grelhas a face com membrana é cinza e a face superior é de cobre (amarelo)).
6. Depositar a(s) grelha(s) nesta posição sobre o volume requerido da(s) amostra(s).
7. Aguardar uns minutos, nunca menos de 1min. Cerca de 15-20mins costuma ser suficiente – varia conforme a natureza da amostra - para uma melhor adsorção à membrana.
8. Diluir uma solução aquosa de acetato de uranilo de forma adequada.
9. Fazer 2 gotas de cerca de 40  $\mu\text{L}$  cada uma, com a solução previamente preparada, sob o *parafilm*, ao lado da gota que possui a amostra com a grelha já em adsorção.
10. Passar a(s) grelha(s) para a(s) primeira(s) gota(s) da solução respetiva(s) de acetato de uranilo, para uma lavagem rápida (alguns segundos a 1min).
11. Passar a(s) grelha(s) para a segunda gota de lavagem, esperar tempo não inferior a 1 minuto. (cerca de 10minutos é suficiente).
12. Retirar a(s) grelha(s) para uma nova placa/suporte forrada com papel de filtro, retirando-lhes o excesso de líquido com um pedaço de papel de filtro para a absorção do excesso.
13. No passo 12 com o auxílio de pinça e de um pedaço de papel de filtro introduzido entre as pontas da pinça empurrar as grelhas sobre o papel de filtro na caixa/suporte preparado para o efeito com a face que possui a membrana para cima.
14. Ir observar as amostras preparadas por contraste negativo ao microscópio eletrónico de transmissão.

*Protocolo elaborado por Rute Miriam Santos Moraes no âmbito da dissertação de mestrado sob orientação da professora Anjos Macedo e professor António Matos.*

## Protocolo A.4 – Imunodeteção em TEM

Tabela A.7 - Anticorpos utilizados nas imunodeteções em EM.

Anticorpos a utilizar para a imunodeteção em Microscopia Eletrónica						
Primários	Designação	Volume enviado	Concentração no tubo	Concentração de utilização	Descrição	Acondicionamento
	Rabbit anti-tGRP (Cterm)	50µL	0,93 µg/µL	1:20	Rabbit polyclonal (GenoGla)	-20°C
	Mouse anti-tMGP	50µL	1 µg/ µL	1:20	Mouse monoclonal (VitaK)	-20°C
	Rabbit anti-FetuinA	20µL	1 µg/ µL	1:40	Rabbit polyclonal (Biovender)	-20°C
	Mouse anti-FetA humana (H-4)	100µL	0,2 µg/ µL	1:40	Mouse monoclonal (Santa Cruz Biotech)	4°C
Secundários	Anti-rabbit Gold 10nm	50µL		1:15	G7402	4°C
	Anti-mouse Gold 5 nm	50µL		1:20	G7527	4°C
Diluição dos ABS	PBS/ 1% BSA (w/v)					

- 100K (**pellett**) dos fragmentos da aorta ou soros de doentes.
- **PBS**
- **Glicina** 50mM em PBS
- **Tampão de bloqueio mais usados:**
  - ✓ PBS/ 5% (w/v) BSA
- **Tampão de lavagem mais usados:**
  - ✓ PBS/0,1% (w/v) BSA
- **Grelhas de EM**, *formvar carbon coated*
- **Parafilm**
- **Pinças limpas Dumont nº7**
- **Reagentes e equipamento adicional para o contraste, inclusão e EM.**

### Adsorção da amostra às grelhas de EM

1. Preparar as grelhas para cada amostra.
2. Colocar uma gota de 3µL em *parafilm* e deixar flutuar cada grelha, sob as gotas respetivas, com o *coated side* virado para a amostra, durante 20mins.

**(15-20 minutos totais da etapa)**



### **Lavagem e bloqueio nas grelhas**

3. Transferir a(s) grelha(s) para a(s) gota(s) de 100µL de PBS colocadas no pedaço de *parafilm* durante **3min. Repetir o passo 2 vezes. Total: 3 vezes – 9 minutos totais.**
4. Passar a grelha por uma gota que contenha PBS/50mM de Glicina durante **3min. Num total de 4 passagens/lavanges (3x4 = 12 minutos).**
5. Transferir a grelha para uma gota de solução de tampão de bloqueio (PBS/5%BSA) por **10 mins.**

**(31 minutos totais da etapa)**

### **Incubação com os Abs primários**

6. Transferir a grelha da gota da solução de bloqueio para uma gota de 4µL do Abs primário requerido e diluído de forma adequada em PBS/1%BSA com/sem Triton X-100 a 0,02%.
7. Deixar incubar durante **1 hora.**
8. Transferir as grelhas para o tampão de lavagem PBS/0,01%BSA, durante **3min.** Repetir esta passagem/transferência **5 vezes, num total de 6 lavagens. Total de tempo: 18 minutos.**

**(1h e 18 minutos totais da etapa)**

### **Incubação com os Abs secundários (conjugados com partículas de ouro)**

9. Incubar com gotas de 4µL do Abs secundário diluído, na diluição apropriada no tampão de bloqueio PBS/1%BSA, durante **1 hora.**
10. Transferir as grelhas para gotas de 100µL de PBS. Lavar durante **2min.** Repetir passo usando 7 novas gotas (transferindo 7 vezes) de PBS, para um **total de 8 lavagens: 16min.**
11. Passar as grelhas de EM para gotas de 50µL de PBS/1% gluteraldeído, por **5 min.**
12. Transferir as grelhas para gotas de 100µL de água, lavar durante **2min.** Repetir o passado com novas gotas de água, 7 vezes, num **total de 8 lavagens: 16mins.**

**(1h e 37 minutos totais da etapa)**

**Nota:** Fazer controlo negativo para cada amostra, respeitante à marcação com o Abs 2º, fazendo o mesmo procedimento, acima, omitindo e substituindo pelo mesmo tampão sem Ab 1º por forma a testar o *background* e se os bloqueios funcionaram ou não.

O volume de Abs primário não usado deverá ser perfeito com o tampão usado, PBS.

Considerando 2 amostras (A e B) com 2Abs (1Ab1 e 1Ab2) e respectivo secundário (2Ab10nm) (considerado o mesmo no exemplo seguinte) temos a seguinte **tabela A.8** de combinações para imunodeteções simples:

**Tabela A.8 - Exemplo de Combinações de Condições a Usar para Imunodeteção.**

	Anticorpo Primário	Anticorpo primário	Anticorpo Secundário
Amostra	1Ab1	1Ab2	2Ab10nm
A	X		X
A		X	X
CTR negativo			X
B	X		X
B		X	X

Considerando 2 amostras (A e B) com 2 Abs primários (1Ab1 e 1Ab2) e respectivos secundários (2Ab10nm e 2Ab5nm) temos a seguinte tabela de combinações para uma colocalização dupla.

**Tabela A.9 - Exemplo de Combinações de Condições a Usar para Colocalização.**

	Anticorpo Primário	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Anticorpo Secundário
Amostra	1Ab1	1Ab2	2Ab10nm	2Ab5nm
A	X	X	X	X
B	X	X	X	X
CTR ao 1Ab2 e 2Ab5nm	X		X	X
CTR ao 1Ab1 e 2Ab10nm		X	X	X

*Protocolo elaborado por Rute Miriam Santos Moraes no âmbito da dissertação de mestrado sob orientação da professora Anjos Macedo e professor António Matos com base no protocolo de (Thery et al., 2006).*

## Protocolo A.5 – Produção de grelhas para TEM

1. Colocar 50mL de solução de dicloreto de etileno para uma solução de 0,7% *formvar* em dicloreto.
2. Pesar numa balança 0,35g de *formvar* e misturar tudo até dissolução completa.
3. Mergulhar uma lâmina de microscopia óptica na proveta que contém a solução anterior. (Presa por um mecanismo que permita que esta fique suspensa e mergulhada na solução até ao nível desejado pelo operador).
4. Deixar a lâmina submersa por um pouco, aproximadamente 1min.
5. Ir subindo a mesma lentamente, para escorrer o excesso de solução das paredes.
6. Deixar a lâmina acima do nível da solução por aproximadamente 30 segundos para esta ficar sujeita ao vapor criado pela solução de dicloreto.
7. Retirar de vez a lâmina da proveta sem nunca tocar com a sua face em lado algum.
8. Deixar a lâmina secar sob papel de filtro, encostada verticalmente a uma superfície sem tocar.
9. Tapar a solução de dicloreto com *parafilm* para ser usada posteriormente na produção de mais membranas para as grelhas.
10. Utilizar uma lâmina/objeto cortante para fazer ligeiros cortes leves sobre as bordas da lâmina onde criamos o filme de *formvar*, para que se possa despegar da superfície de vidro da lâmina quando em contacto com a água.
11. Mergulhar lentamente a lâmina numa tina cheia q.b. de água, com um determinado ângulo (cerca de 45°) após corte das extremidades do filme da superfície da lâmina de microscopia.
12. Quando o filme se libertar por completo para a tina de água, ficando a flutuar, depositar sobre o mesmo as grelhas 300Mesh-Cu cuidadosamente. Com a sua face baça em contato com o filme flutuante.
13. Com a nossa mão, num movimento rápido e preciso, e com a ajuda de um papel de filtro colocar este rapidamente sobre as grelhas e inverter a posição, fazendo um movimento de mergulho com a mão em que se descreve um ângulo de 180° debaixo de água. Por forma a ficarmos com a membrana à superfície das grelhas e com o seu lado brilhante voltado para baixo sobre o papel de filtro utilizado.
14. Deixar secar sobre o papel de filtro.
15. Submeter as grelhas a uma deposição de carbono evaporado sobre as mesmas no evaporador de vácuo.
16. Destacar as grelhas com uma pinça.
17. Prontas a serem utilizadas.

**Nota:** Se ao mergulharmos as grelhas com o filme no ponto 14 não conseguirmos o pretendido podemos reaproveitar as grelha lavando com álcool a 96% e passando-as por clorofórmio. Deixar secar.

*Protocolo elaborado por Rute Miriam Santos Moraes no âmbito da dissertação de mestrado sob orientação da professora Anjos Macedo e professor António Matos.*

*Diretrizes dadas pelo professor António Matos.*

*Com base em (Thery et al., 2006).*